

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARIZE MAZUR

**ESPECTROSCOPIA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DE AMIDO DE MILHO COMUM E CEROSO
APÓS INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE**

CURITIBA

2016

LARIZE MAZUR

**ESPECTROSCOPIA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DE AMIDO DE MILHO COMUM E CEROSO
APÓS INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosemary Hoffmann Ribani
Co-orientador: Prof. Dr. Egon Schnitzler

CURITIBA

2016

Mazur, Larize

Espectroscopia para determinação de compostos fenólicos e avaliação de amido de milho comum e ceroso após incorporação de extratos de erva-mate / Larize Mazur. – Curitiba, 2016.

157 f. : il.; tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Rosemary Hoffmann Ribani

Coorientador: Egon Schnitzler

Bibliografia: p.136-157

1. Erva-mate. 2. Fenóis. 3. Amido - Milho. I. Ribani, Rosemary
II. Schnitzler, Egon. III. Título.

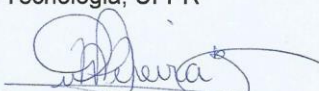
CDD 663.96

LARIZE MAZUR

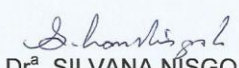
**ESPECTROSCOPIA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
E AVALIAÇÃO DE AMIDO DE MILHO COMUM E CEROSO APÓS
INCORPORAÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE**

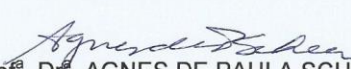
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da
Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos
professores:


Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a. Dr.^a. MILENE OLIVEIRA PEREIRA BICUDO
Campus Dois Vizinhos, UTFPR


Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO LACERDA
Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, UEPG


Prof.^a. Dr.^a. SILVANA NISGOSKI
Setor de Ciências Agrárias, UFPR


Prof.^a. Dr.^a. AGNES DE PAULA SCHEER
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 08 de agosto de 2016.

A Deus.

Ao meu companheiro, Bruno.

À minha mãe Roseli e minha irmã Alexandra.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre iluminou meu caminhando, me dando forças e sabedoria para seguir em frente após as dificuldades.

Ao meu marido, amigo e companheiro **Bruno Rizental Koubik** pelo seu amor, pela sua compreensão nos momentos de maior dificuldade e pelo incentivo de nunca desistir.

A minha **mãe e amiga Roseli**, que sempre foi minha inspiração de vida, por todo amor e incentivo nessa jornada. Ao **Luiz**, que estando ao lado da minha mãe sempre esteve me auxiliando nesta etapa da minha vida.

A minha irmã **Alexandra**, que sempre me aconselhou a nunca desistir.

A **minha família**, que sempre esteve ao meu lado, em especial meus avós **Vanda e Jacob**, pelo exemplo de luta e dignidade, e minha **Tia Lucia**, que sempre torceu pelo meu sucesso.

À minha orientadora Prof^a Dr^a **Rosemary Hoffmann Ribani**, pela confiança, dedicação, amizade e toda paciência. Este trabalho não seria possível sem sua dedicação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Egon Schnitzler** pela sua orientação, pelos seus ensinamentos e pela sua amizade.

Aos **Membros da Banca**, que se disponibilizaram em avaliar meu trabalho e contribuir com suas observações.

Aos meus **amigos** que ao longo desta jornada de alguma forma ou de outra ajudaram para realização deste trabalho.

À minha amiga **Luana**, que sempre esteve perto me ajudando, aconselhando e fazendo com que eu fosse sempre em frente.

À minha Amiga de mais de uma década, **Emanuele**, que me abrigou em sua casa quando eu precisava e sempre esteve perto me ajudando nas dificuldades.

À **Layse**, que no momento de maior dúvida da Tese estava me ajudando no que fosse preciso, com seus conhecimentos e sua amizade.

Aos funcionários, **Paulo, Patrícia, Andreia e Marcelo** pelo auxílio durante o doutorado.

À **Ervateira Baldo** pela doação das amostras de erva-mate e disposição em ajudar.

Ao **PPGEAL** pela oportunidade de realizar o doutorado.

A **UEPG** pela disponibilidade de realização das análises.

À **CAPES** pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

RESUMO

A erva-mate é amplamente consumida na América do Sul como chá quente, “chimarrão” e “tererê”, o que representa uma atividade econômica importante em vários países da região. As folhas de erva-mate contêm altas concentrações de compostos fenólicos, principalmente taninos, flavonóides e ácidos fenólicos. A identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes na erva-mate é tradicionalmente realizada através de cromatografia líquida. No entanto, esta técnica é demorada e requer procedimentos de extração prévia dos compostos fenólicos. Análises de espectroscopia no infravermelho têm sido empregadas como ferramentas analíticas alternativas rápidas, seletivas, de simples operação e baixo custo. O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de utilização de análises de infravermelho, em substituição a análises de cromatografia líquida, para quantificação dos compostos fenólicos (rutina, ácido 5-cafeoilquínico, ácido caféico e conteúdo fenólico total). Também foram avaliadas as características do amido de milho (ceroso e comum) nativo e incorporado de extratos de erva-mate por meio de técnicas termoanalíticas, técnicas estruturais e reológicas. A análise de componentes principais (PCA) e processos de calibração multivariada, particularmente a regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR), foram utilizados com o objetivo de desenvolver modelos para previsão dos teores de rutina, ácido 5-cafeoilquínico, ácido caféico e conteúdo fenólico total, através de espectroscopia no infravermelho próximo, com Transformada de Fourier, no modo de reflectância difusa. Os modelos de regressão para previsão do teor de compostos fenólicos em erva-mate apresentaram erro absoluto durante a validação externa de 12,02%, 5,38%, 18,31% e 3,44%, respectivamente para a rutina, ácido 5-cafeoilquínico, ácido caféico e conteúdo fenólico total. Estes dados demonstram que análises de espectroscopia de infravermelho podem ser utilizadas para predição dos teores de compostos fenólicos em erva-mate. Estes dados ainda demonstram que análises de infravermelho podem ser utilizadas como técnica alternativa eficaz e rápida para predição dos teores de compostos fenólicos em erva-mate em substituição a tradicionalmente utilizada cromatografia líquida. Resultados da análise Termogravimétrica (TG) das amostras de amido de milho ceroso tratadas com extratos aquosos de erva-mate e o amido de milho comum adicionado de extrato *alcóolico* de erva-mate demonstraram um aumento da estabilidade térmica das amostras. Análise de DSC confirmou uma modificação da Entalpia de Gelatinização (ΔH_{gel}) dos amidos após as incorporações de extratos de erva-mate. Pelo RVA observou-se a diminuição nas viscosidades de pico e final em todas as amostras tratadas. Por meio da análise DRX caracterizou-se o padrão do amido de milho como tipo A e verificou-se aumento na cristalinidade das amostras tratadas. As micro-imagens (MEV) possibilitaram o estudo da estrutura dos grânulos de amido. Através das análises FTIR e PCA foi observada uma diferença entre as amostras de amido nativas e tratadas. Desta forma foi verificado que tanto nas amostras de amido de milho ceroso quanto no comum, o extrato de erva-mate provocou mudanças nas propriedades térmicas, estruturais e reológicas no amido nativo, de interesse para uma futura aplicação na indústria alimentícia.

Palavras – chaves: Erva mate, compostos fenólicos, NIR, amido

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is widely consumed in South America as hot tea, “chimarrão” and “tererê”, representing an important economic activity in several countries within this region. Yerba mate leaves contain high concentrations of phenolic compounds, mainly tannins, flavonoids and phenolic acids. Identification and quantification of phenolic compounds in yerba mate are traditionally performed by liquid chromatography. However, this technique is time consuming and requires prior extraction of phenolic compounds. Infrared spectroscopy analysis has been used as an alternative, selective and fast analytic tool, of simple operation and low cost. The aim of this study was to evaluate the possibility of using infrared analysis for the replacement of liquid chromatography analysis to quantify the phenolic compounds (rutin, 5-caffeoylquinic acid, caffeic acid and Total Phenolic Content) in Yerba mate samples. Also the corn starch characteristics (waxy and common) native and incorporated in yerba mate extracts were evaluated by means of thermoanalytical techniques, structural techniques and pasting properties. The principal component analysis (PCA) and multivariate calibration, particularly the partial least squares regression (PLS), were used in order to develop models to validate determinations of the rutin, 5-caffeoylquinic acid, caffeic acid and Total Phenolic Content from the near infrared spectra in diffuse reflectance mode. Regression models to predict the phenolic compounds in yerba showed values of absolute error for external validation of 12.02%, 5.38%, 18.31% and 3.44%, respectively for the rutin, 5-caffeoylquinic acid, caffeic acid and Total Phenolic Content. These data demonstrate that infrared spectroscopic analysis may be used as an alternative technique for effective and rapid prediction of content of phenolic compounds in yerba mate to substitute traditionally used liquid chromatography. Results of the Thermogravimetric (TG) analysis of waxy corn starch samples treated with yerba mate aqueous extracts and the common corn starch added with alcoholic extract of yerba mate showed an increase in thermal stability of the samples. DSC analysis confirmed a change in enthalpy of gelatinization (Δh_{gel}) starches after the mergers of yerba mate extracts. A decrease in the final and peak viscosity in all treated samples was observed utilizing RVA. XRD analysis allowed characterizing the corn starch diffraction pattern as A-type and was observed an increase in the crystallinity of the treated samples. The micro-images (SEM) enabled to study the structure and surface of starch granules. Through FTIR and PCA analyzes a difference between the native and treated starch samples was observed. Thus, it was found that both in the waxy maize starch samples as in common, yerba mate extract caused changes in the thermal properties, structural and rheological properties in the native starch, of interest for future application in the food industry.

Key – words: Yerba mate, phenolic compounds, NIR, starch.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - ÁREA DE OCORRÊNCIA DA ERVA-MATE NA AMÉRICA DO SUL. | 26 |
| FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO AGROINDUSTRIAL DA ERVA-MATE | 28 |
| FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA | 33 |
| FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO | 34 |
| FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CAFEÍCO | 34 |
| FIGURA 6 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO (FREQUÊNCIAS DE GRUPOS FUNCIONAIS) NA REGIÃO NIR E A SUA LOCALIZAÇÃO NO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO..... | 41 |
| FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA REFLECTÂNCIA DIFUSA | 42 |
| FIGURA 8 - DIAGRAMA DE CONSTRUÇÃO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO PLS..... | 45 |
| FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DE UMA CURVA TG-DTG..... | 54 |
| FIGURA 10 - CURVA GENÉRICA PARA ANÁLISE DE DSC. | 55 |
| FIGURA 11 - CURVA TÍPICA OBTIDA EM ANÁLISE NO RVA, APRESENTANDO OS PARÂMETROS QUANTIFICADOS PARA PROPRIEDADE DE PASTA..... | 56 |
| FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS FENOLICOS 5- CQA, AC E RUTINA E RESPECTIVOS ESPECTROS..... | 65 |
| FIGURA 13 - ESPECTROS DAS 42 AMOSTRAS DE ERVA-MATE EM DUPLICATA, COLETADOS NO ESPECTRÔMETRO BRUKER – TENSOR 37, EQUIPADO COM UM ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA DIFUSA. | 66 |
| FIGURA 14 - PCA DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE EM UM INTERVALO DE ONDA DE 4000 A 10000 CM ⁻¹ | 67 |
| FIGURA 15 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA RUTINA/ INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE..... | |
| FIGURA 16 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA RUTINA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE | 71 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 17 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ROTINA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE. | 72 |
| FIGURA 18 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE..... | 74 |
| FIGURA 19 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE..... | 75 |
| FIGURA 20 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE..... | 76 |
| FIGURA 21 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO 5-CQA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE..... | 79 |
| FIGURA 22 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO 5-CQA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE..... | 79 |
| FIGURA 23 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 35 AMOSTRAS. | 82 |
| FIGURA 24 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 35 AMOSTRAS. | 83 |
| FIGURA 25 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 33 AMOSTRAS. | 84 |
| FIGURA 26 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 33 AMOSTRAS. | 85 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 27 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO (33 AMOSTRAS) PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE | 86 |
| FIGURA 28 - CURVAS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D=EEM2 A 5%) E (E=EEM2 A 15%)..... | 99 |
| FIGURA 29 – CURVAS DSC AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADO DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D=EEM2 A 5%) E (E=EEM2 A 15%). | 100 |
| FIGURA 30 - CURVAS RVA PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D=EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 105 |
| FIGURA 31 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 106 |
| FIGURA 32 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (4.000-400 CM^{-1}) DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%)..... | 109 |
| FIGURA 33 – GRÁFICO DE SCORES DO PCA NA ANÁLISE DO AMIDO DE MILHO CEROSO NATIVO (A OU 2) E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B OU 3=EEM1 A 5%), (C OU 4=EEM1 A 15%), (D OU 5= EEM2 A 5%) E (E OU EEM2 A 15%)..... | 110 |
| FIGURA 34 – MICRO-IMAGENS OBTIDOS NO MEV DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 111 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 35 - CURVAS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 122 |
| FIGURA 36 – CURVAS DSC DO AMIDO DE MILHO COMUM NATIVO (A) E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 123 |
| FIGURA 37- CURVAS RVA PARA AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 125 |
| FIGURA 38 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM NATIVO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 127 |
| FIGURA 39 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (4.000 - 400 CM^{-1}) DAS AMOSTRAS DE AMIDOS NATIVO (A) E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 129 |
| FIGURA 40 – GRÁFICO DE SCORES DO PCA NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE AMIDO COMUM (A OU 2) AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCOÓLICO DE ERVA-MATE/EEM (B OU 3=EEM1 A 5%), (C OU 4=EEM1 A 15%), (D OU 5= EEM2 A 5%) E (E OU 6= EEM2 A 15%). | |
| FIGURA 41 - GRÁFICO DE SCORES DO PCA NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE AMIDO COMUM (A OU 2) AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCOÓLICO DE ERVA-MATE/EEM (B OU 3=EEM1 A 5%), (C OU 4=EEM1 A 15%), (D OU 5= EEM2 A 5%) E (E OU 6= EEM2 A 15%) JUNTAMENTE COM AMOSTRAS DE AMIDO CEROSO NATIVO (7) AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (8=EEM1 A 5%), (9=EEM1 A 15%), (10= EEM2 A 5%) E (11= EEM2 A 15%). | 131 |

FIGURA 42 – MICRO-IMAGENS OBTIDOS NO MEV DAS AMOSTRAS DE AMIDO COMUM NATIVO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%)..... 132

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - PRODUÇÃO AGRÍCOLA DE ERVA-MATE NO ESTADO DO PARANÁ (TONELADAS)..... | 27 |
| TABELA 2 - REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO | 38 |
| TABELA 3 - APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA IR | 39 |
| TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO (MG G ⁻¹) DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE QUANTIFICADOS POR HPLC..... | 64 |
| TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ANALISADOS | 65 |
| TABELA 6 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA RUTINA..... | 69 |
| TABELA 7 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE RUTINA PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE | 72 |
| TABELA 8 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO..... | 74 |
| TABELA 9 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE ÁCIDO CAFÉICO PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE..... | 77 |
| TABELA 10 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO 5 -CQA..... | 78 |
| TABELA 11 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE ÁCIDO 5-CQA PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE..... | 80 |
| TABELA 12 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS | 81 |
| TABELA 13 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL SEM AMOSTRA 19 E 20 | |
| TABELA 14 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE | 86 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO 5-CQA, AC, RUTINA E CFT DE AMOSTRAS DE ERVA-MATE DETERMINADOS POR HPLC | 92 |
| TABELA 16 - RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA COMPOSTOS FENÓLICOS NAS AMOSTRAS DE AMIDOS ANALISADAS (PPM DE ÁCIDO GÁLICO)..... | 96 |
| TABELA 17 - RESULTADOS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMIDO DE MILHO CEROSO MODIFICADO POR EXTRATOS DE ERVA-MATE (B), (C), (D) E (E)..... | 98 |
| TABELA 18 - RESULTADOS DSC PARA AS AMOSTRAS A, B, C, D E E.... | 101 |
| TABELA 19 - RESULTADOS RVA AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO NATIVO (A) E INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 104 |
| TABELA 20 - GRAU DE CRISTALINIDADE RELATIVA PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%) | 106 |
| TABELA 21 - PICOS OBTIDOS POR MEIO DOS DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%)..... | 107 |
| TABELA 22 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO 5-CQA, AC, RUTINA E CFT DAS AMOSTRAS 1 E 2 DE ERVA-MATE DETERMINADOS POR HPLC. | 116 |
| TABELA 23 - RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA COMPOSTOS FENÓLICOS NAS AMOSTRAS DE AMIDOS ANALISADAS (PPM DE ÁCIDO GÁLICO)..... | 120 |
| TABELA 24 - RESULTADOS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=E 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | |
| TABELA 25 - RESULTADOS DSC PARA AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 124 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 26 - RESULTADOS RVA DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%). | 126 |
| TABELA 27 - GRAU DE CRISTALINIDADE RELATIVA PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%)..... | 128 |
| TABELA 28 - PICOS OBTIDOS POR MEIO DOS DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%)..... | 128 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Ácido Caféico

CFT – Compostos Fenólicos Totais

CQA – Ácido cafeoilquínico

DRX – Difractometria de Raio X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

DTG – Termogravimetria Derivada

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta eficiência

IR – Infravermelho

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MSC – Correção Multiplicativa do Sinal

NIR – Infravermelho Próximo

PCA –Análise dos Componentes Principais

PLS –Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

R^2 – Coeficiente de Correlação de Calibração

RMSECV – Raiz do Quadrado do Erro Médio de Validação Cruzada

RMSEP –Raiz do Quadrado do Erro Médio de Previsão

RVA – Rápido Visco- Analisador

SNV – Transformação Padrão Normal de Variação

TG - Termogravimetria

VL – Variável Latente

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 22 |
| OBJETIVOS..... | 23 |
| <i>Objetivo Geral</i> | 23 |
| <i>Objetivos Específicos</i> | 24 |
| CAPÍTULO I | 25 |
| REVISÃO DA LITERAURA | 25 |
| 1. REVISÃO DA LITERATURA | 26 |
| 1.1. ERVA-MATE | 26 |
| 1.1.1. <i>Processamento agroindustrial</i> | 28 |
| 1.1.2. <i>Composição química</i> | 30 |
| 1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS | 32 |
| 1.3. AMIDO | 36 |
| 1.3.1. <i>Amido Modificado</i> | 37 |
| 1.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) | 38 |
| 1.5. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... | 43 |
| 1.5.1. <i>Análise de Componentes Principais (PCA)</i> | 46 |
| 1.5.2. <i>Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)</i> | 46 |
| 1.5.3. <i>Pré – Processamentos Espectrais</i> | 49 |
| 1.6. MÉTODOS TERMOANLÍTICOS | 51 |
| 1.6.1. <i>Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG)</i> | 52 |
| 1.6.2. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> | 54 |
| 1.6.3. <i>Propriedades De Pasta</i> | 56 |
| CAPÍTULO II | 58 |
| APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ERVA-MATE .. | 58 |
| 2.1. INTRODUÇÃO | |
| 2.2. MATERIAL E MÉTODOS | 61 |
| 2.2.2. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS..... | 61 |
| 2.2.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC .. | 62 |
| 2.2.5. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO | 62 |
| 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 63 |
| 2.3.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS | 63 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.2. ESPECTROSCOPIA NIR | 66 |
| 2.3.3. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... | 67 |
| 2.4 CONCLUSÃO | 87 |
| CAPITULO III | 89 |
| EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NO AMIDO DE MILHO CEROSO | 89 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 90 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS | 92 |
| 3.2.1 INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO AMIDO | 92 |
| 3.2.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS | 93 |
| 3.2.3 TERMOGRAVIMETRIA / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG) | 93 |
| 3.2.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) | 94 |
| 3.2.5 PROPRIEDADES DE PASTA | 94 |
| 3.2.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X..... | 94 |
| 3.2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 95 |
| 3.2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 95 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 96 |
| 3.3.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS..... | 96 |
| 3.3.4 PROPRIEDADES DE PASTA | 102 |
| 3.3.5 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X | 105 |
| 3.3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 108 |
| 3.3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 111 |
| 3.4. CONCLUSÃO | 111 |
| CAPÍTULO IV | 113 |
| EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE NAS PROPRIEDA TÉRMICAS, REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NO AMIDO DE MILHO CC | 113 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 114 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 116 |
| 4.2.1 INCORPORAÇÃO DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA MATE NO AMIDO | 116 |
| 3.2.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS..... | 117 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.3 TERMOGRAVIMETRIA / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG) | 117 |
| 4.2.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) | 118 |
| 4.2.5 PROPRIEDADES DE PASTA | 118 |
| 4.2.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X..... | 118 |
| 4.2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 119 |
| 4.2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 119 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 120 |
| 4.3.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS..... | 120 |
| 3.3.4 PROPRIEDADES DE PASTA | 124 |
| 3.3.5 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X..... | 127 |
| 3.3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 129 |
| 3.3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 131 |
| 3.4. CONCLUSÕES | 132 |
| CONCLUSÕES FINAIS..... | 134 |
| REFERÊNCIAS | 137 |

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore da família das Aquifoliáceas e ocupa uma região da América do Sul de aproximadamente 540.000 km² situada entre o Brasil, Argentina e o Paraguai. A planta é utilizada para preparar o mate, uma bebida estimulante e tradicional em diversas regiões da América do Sul. A erva-mate apresenta diversos compostos químicos, como compostos fenólicos e metilxantinas, que conferem propriedades funcionais, além do sabor característico.

A erva-mate é consumida na forma de chimarrão, tererê e chá (verde ou tostado). Atualmente, a erva-mate vem ganhando mercado internacional, sendo exportada para os Estados Unidos, Europa e Ásia, como vegetal ou na forma de extratos para ser utilizada em alimentos funcionais e preparações fitofarmacêuticas.

O controle do teor de compostos fenólicos se caracteriza como etapa fundamental no processamento de erva-mate, devido ao fato destes compostos apresentarem capacidade antioxidante pronunciada correlacionada com o conteúdo do flavonol rutina e dos derivados cafeoilquínicos como os ácidos caféico e 5-cafeoilquínico, entre outros compostos.

A Cromatografia Líquida é o método classicamente empregado para a quantificação de compostos fenólicos em erva-mate, podendo ser realizado através de eluição isocrática ou por gradiente de fase móvel, porém se caracteriza por um método demorado e de custos elevados.

A Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) vem sendo muito utilizado nas indústrias farmacêuticas, agro-alimentícias e petroquímicas. Este método de análise se caracteriza por ser rápido, não destrutivo e sem geração de subprodutos tóxicos ou resíduos. Além disso, o NIR pode ser aplicado no controle de qualidade *online* nas indústrias. Para a região NIR, os sinais vibracionais observados são devido à sobretons e bandas de combinação de estiramento e de deformações angulares de transições fundamentais de ligações C-H, N-H e O-H. O NIR pode ser uma alternativa para substituir a cromatografia líquida nas análises de rotina nas indústrias ervateiras para a quantificação dos compostos fenólicos.

A incorporação de compostos fenólicos em sistemas alimentícios pode ser uma prática promissora para o desenvolvimento de alimentos funcionais, como no caso de amidos nativos de arroz, milho e trigo. Estes compostos podem modificar propriedades como retrogradação, viscosidade e gelatinização destes amidos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver modelos multivariada para determinação dos teores de Rutina, ácido caféico, ácido 5-CQA e conteúdo fenólico total em amostras de erva-mate, bem como avaliar a influência de infusões de erva-mate nas propriedades térmicas, de pasta e estruturais dos amido de milho comum e ceroso.

O texto é dividido em quatro capítulos mais considerações finais. No Capítulo 1 é feita uma revisão da literatura, no Capítulo 2 é apresentada o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada, no Capítulo 3 e 4 são avaliados os amidos de milho ceroso e comum, respectivamente, após a incorporação de extratos de erva-mate, finalizando o texto com as considerações gerais do trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de modelos de calibração para prever os teores dos compostos fenólicos em erva-mate, através da correlação de espectros obtidos no infravermelho próximo e dados determinados por HPLC. O segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da incorporação de extratos aquosos e alcóolicos em amido de milho comum e ceroso, através da avaliação das propriedades térmicas, de pasta e estruturais dos amidos.

Objetivos Específicos

- Extrair e quantificar os compostos fenólicos (Ácido Caféico, Ácido 5-CQA, Rutina) em amostras de erva-mate, de diferentes municípios do Paraná e diferentes safras utilizando a cromatografia líquida (HPLC).
- Obter os espectros das amostras no Infravermelho Próximo e avaliar através de uma PCA se há diferença entre as amostras avaliadas.
- Desenvolver modelos multivariados para prever os teores dos compostos fenólicos em amostras de erva-mate através da correlação dos espectros NIR e os teores determinados por HPLC.
- Avaliar o amido de milho ceroso após a incorporação de extratos aquosos de erva-mate, preparados utilizando duas amostras de erva-mate distintas nas concentrações de 5 e 15%.
- Avaliar o amido de milho comum após a incorporação de extratos alcóolicos de erva-mate, preparados a partir de duas amostras distintas de erva-mate nas concentrações de 5 e 15%.
- Determinar as propriedades térmicas dos amidos em estudo, em seus estados nativos e após o tratamento com os extratos de erva-mate.
- Verificar a cristalinidade do material sólido a partir da difratometria de raios X (DRX) e a estrutura através da microscopia de varredura eletrônica (MEV).
- Caracterizar as propriedades de pasta (RVA) dos amidos nativos e amidos tratados com extratos de erva-mate.

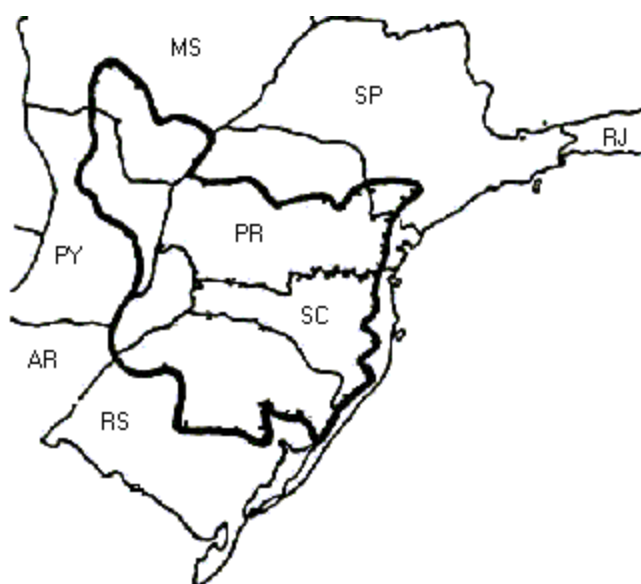
CAPÍTULO I
REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. ERVA-MATE

A erva-mate é nativa da América do Sul, sendo cultivada na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (MAZUCHOWSKI, 1989; FILIP; FERRARO, 2003). A Figura 1 representa a ocorrência da erva-mate na América do Sul. Entretanto, cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, distribuindo-se entre os Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MACCARI JÚNIOR; SANTOS, 2000).

FIGURA 1 - ÁREA DE OCORRÊNCIA DA ERVA-MATE NA AMÉRICA DO SUL.



FONTE: ADAPTADO DE ROTTA; OLIVEIRA (2005).

No ano de 2013 a produção agrícola de erva-mate foi 515 milhões de toneladas de folhas, de acordo com os dados do IBGE, conforme apresentado na Tabela 1.

O consumo de chimarrão faz parte do hábito alimentar e cultural dos países sul-americanos. Os primeiros relatos de consumo desta bebida no Brasil datam de meados do século XVI na população indígena (SEAB, 1997; ANUÁRIO BRASILEIRO DE ERVA-MATE, 1999). Estudos mostram que aproximadamente

30% da população total da América do sul consomem mais de um litro de chimarrão por dia (FILIP *et al.*, 2000; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005). Este consumo caiu em 2014 devido à alta no valor da erva-mate, o que levou seus consumidores a mudarem seus hábitos de consumo, como por exemplo a diminuição no tamanho da cuias para consumo do chimarrão.

TABELA 1 - PRODUÇÃO AGRÍCOLA DE ERVA-MATE NO ESTADO DO PARANÁ (TONELADAS).

| ANO | BRASIL | PR | SC | RS | MS |
|--------------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|
| 2001 | 645,965 | 339,139 | 48,834 | 252,045 | 5,947 |
| 2002 | 513,526 | 221,779 | 45,600 | 240,252 | 5,895 |
| 2003 | 501,702 | 201,694 | 52,474 | 238,949 | 8,585 |
| 2004 | 403,281 | 133,449 | 37,577 | 222,884 | 9,371 |
| 2005 | 429,730 | 164,752 | 37,629 | 218,982 | 8,367 |
| 2006 | 434,483 | 165,076 | 35,292 | 229,569 | 4,546 |
| 2007 | 438,474 | 136,266 | 37,909 | 259,317 | 4,982 |
| 2008 | 434,727 | 132,556 | 41,890 | 256,352 | 3,929 |
| 2009 | 443,126 | 135,000 | 46,254 | 258,651 | 3,221 |
| 2010 | 430,305 | 123,132 | 43,266 | 260,413 | 3,494 |
| 2011 | 443,635 | 122,202 | 45,614 | 272,719 | 3,100 |
| 2012 | 513,256 | 180,853 | 69,064 | 260,866 | 2,473 |
| 2013 | 515,451 | 195,403 | 50,740 | 265,515 | 3,793 |
| Part. Total | 100% | 38% | 10% | 52% | 1% |

FONTE: PAM (PESQUISA AGRÍCOLA MUNICIPAL), 2013.

No Paraná os maiores municípios produtores em 2013 foram: Cruz Machado, São Mateus do Sul, Bituruna, General Carneiro, Paula Freitas e Inácio Martins. Juntos responderam por 60% da produção da cultura no Estado (DERAL, 2013).

A erva-mate pode ser consumida basicamente de três formas, na forma de chimarrão, tererê ou chá. O consumo de chimarrão é a forma mais tradicional, e é feito através da adição de água quente (entre 70 e 85°C) em um recipiente na forma de vaso (CUIA), que já contém uma porção de erva-mate seca e moída, sendo esta água sugada por uma bomba. O consumo de erva-mate na forma de tererê é semelhante ao do chimarrão, sendo adicionada água fria (5 a 10°C) no lugar da água quente (RAMALLO *et al.*, 1998).

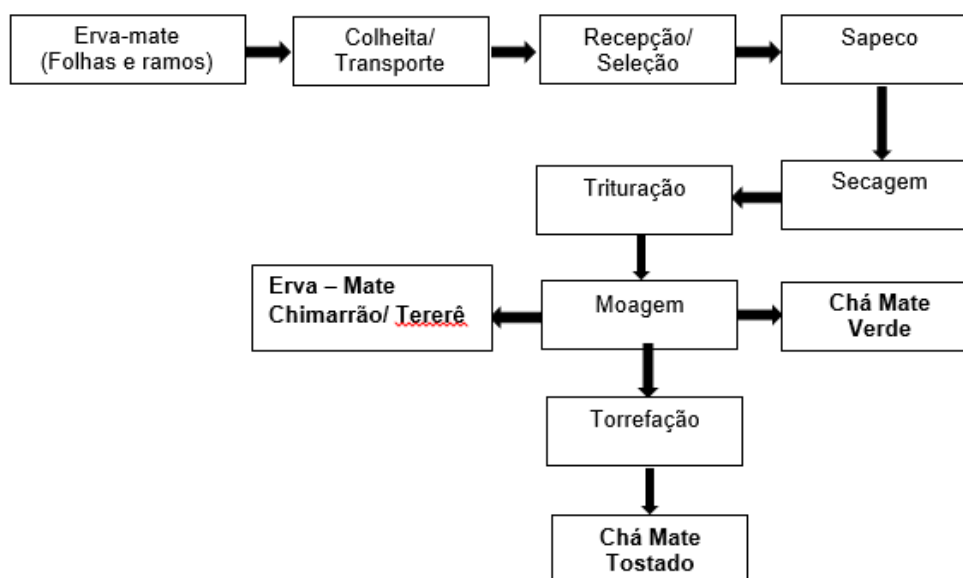
Além do consumo de erva-mate em bebidas estimulantes, esta vem sendo muito empregada como aditivo nas indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas devido à diversidade de compostos fitoquímicos presente (JACQUES *et al.*, 2007).

Os índios guaranis, que habitavam a região compreendida pelas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, foram os primeiros a consumir erva mate. Os primeiros relatos deste consumo datam de 1554. Eles adotaram o uso da erva-mate como bebida tônica e estimulante, difundindo-a entre as tribos, até mesmo como artigo de troca. A erva-mate era transportada por milhares de quilômetros, chegando a tribos da Argentina, Bolívia, Chile e Peru (LINHARES, 1969).

1.1.1. Processamento agroindustrial

A erva-mate é constituída por folhas, ramos e galhos quando se encontra *in natura* e é submetida a várias operações industriais como apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO AGROINDUSTRIAL DA ERVA-MATE



FONTE: O autor.

Após a colheita as folhas e ramos de erva-mate passam pela etapa do sapeco, considerado como o estágio primário para a liberação dos compostos voláteis indesejáveis (RAMALLO *et al.*, 2001). O sapeco é caracterizado como um tratamento térmico com a finalidade de inativar enzimas como a peroxidase e polifenoloxidase, utilizando altas temperaturas (MACCARI JÚNIOR; SANTOS,

2000; SANTOS, 2009). Estas enzimas encontradas na erva-mate *in natura*, quando não tem sua atividade enzimática reduzida causam escurecimento das folhas e alteram o sabor das bebidas obtidas com o produto desidratado, normalmente conferindo amargor (SANTOS, 2009). Assim, o sapeco deve ser realizado logo após a colheita, no prazo de até 24 h, para evitar a fermentação, que é favorecida pela umidade e temperatura, causando a perda da erva-mate colhida (MACCARI JÚNIOR; SANTOS, 2000).

O sapeco é normalmente realizado em cilindros metálicos, giratórios e inclinado, e consiste no contato rápido dos ramos e folhas da erva-mate com as chamas de fogo (PARANÁ, 2000).

Os processos normalmente usados para a realização do sapeco utilizam temperaturas da erva-mate na entrada do sapecador de até 600°C e, na saída, de até 120°C. O tempo de permanência oscila em torno de 60 segundos a 8 minutos (ESMELINDRO, 2002; VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

As características sensoriais como aroma e sabor de bebidas de erva-mate apresentam variações em função do processo de sapeco e secagem, onde o binômio tempo e temperatura de processamento influenciam na degradação de compostos fitoquímicos que conferem atributos a erva-mate. O material utilizado para gerar calor nessas etapas de processamento industrial também confere odores e sabores diversos à erva-mate, como os de fumaça, floral, madeira, tostado e azedo (KAWAKAMI; KOBAYASHI, 1991).

A operação de secagem é definida como a separação da água de uma substância pela aplicação de calor, sendo executada a transferência de água e substâncias voláteis para uma fase de vapor. A secagem visa reduzir o teor de umidade das folhas de erva-mate para valores aproximados de 5%, o que diminui a possibilidade de deterioração microbiana e degradação enzimática dos constituintes nutricionais e químicos da erva-mate (PARANÁ, 2000; VALDUGA; FINZER; MOSELE, 2003).

A secagem da erva-mate ocorre normalmente através da passagem de ar quente pela amostra em temperaturas que variam de 60 a 130°C, podendo ser encontrados outros valores na literatura, porém poucos usuais (NUÑEZ; KÄNZIG, 1995; ZANOELO, 2005; SCHMALKO; SCIPIONI; FERREYRA, 2007; ZANOELO; DI CELSO; KASKANTZIS, 2007; ABITANTE, 2007).

Após seca a erva-mate é triturada sendo então chamada de cancheada, esta denominação vem do fato desta operação ser realizada inicialmente em local assoalhado conhecido como cancha (COSTA, 1995), sendo feita atualmente em trituradores ou cancheadores (MENDES, 2005).

A erva-mate cancheada é a matéria-prima para a erva utilizada para o chimarrão, sendo peneirada, misturada em proporções de folhas e palitos de acordo com produto desejado. A erva-mate cancheada é armazenada em sacos, tulhas ou a granel quando destinada ao mercado interno e externo. Para produção de erva-mate para chimarrão, após a mistura, a erva-mate é moída para reduzir a granulometria do material, utilizando moinho de facas ou soque (VALDULGA; FINZER; MOSELE, 2003).

1.1.2. Composição química

A erva-mate apresenta em sua composição química diferentes grupos químicos, como saponinas, alcaloides, compostos fenólicos e óleo essencial, além das vitaminas A, C, B1, B2 e B6, e minerais como magnésio, ferro, fósforo, potássio, zinco, sódio (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; ALONSO, 1998; HEINRICHS; MALAVOLTA, 2001).

Por muito tempo acreditou-se que somente as metilxantinas eram interessantes do ponto de vista farmacológico pela capacidade de estimular o sistema nervoso central (GONZALES *et al.*, 1993), sendo a cafeína a mais estudada. Porém hoje se conhecem também substâncias polifenólicas que apresentam atividade antioxidante na erva-mate (SCHINELLA *et al.*, 2000).

A composição química da erva-mate, de acordo com Valduga *et al.* (1997), está relacionada ao estágio evolutivo da planta, à época de colheita, as características climáticas e do solo, entre outros.

Atualmente as indústrias ervateiras vêm tentando produzir produtos com melhores características sensoriais e com maior preservação dos compostos fitoquímicos. Para isto, vem se buscando melhorias nas etapas de processamento já usadas e investindo também em novas tecnologias, principalmente nas etapas de sapeco e secagem (SCHMALKO; ALZAMORA,

2005; SCHMALKO; MORAWICKI; RAMALLO, 1997; ZANOELO; ABITANTE; MELEIRO, 2008).

Após secas as folhas de erva-mate sofrem alterações na composição química. Estudos mostram que ocorre uma perda acentuada no teor de clorofila provavelmente devido ao uso de altas temperaturas no processamento (SCHMALKO; ALZAMORA, 2001). Bastos *et al.* (2006) relataram que o teor de umidade das folhas varia durante as fases do processamento e afeta o teor de sólidos solúveis, bem como a concentração de compostos bioativos através da extração aquosa. Além disso, as condições de processamento e armazenamento da erva-mate podem afetar as propriedades antioxidantes do mesmo (MANZOCCO; ANESE; NICOLI, 1998).

Uma experiência com folhas de erva-mate, onde as condições agrônômicas foram variadas de forma controlada, tais como, a exposição à luz, tipo de fertilizantes e idade das folhas, bem como da temperatura, mostraram que os minerais têm um papel chave na composição e na estabilidade térmica das folhas no processo de secagem. Portanto, as mudanças no perfil mineral das folhas de erva-mate durante as etapas de processamento podem fornecer importantes dados relativos a aspectos nutricionais, bem como problemas de contaminação (JACQUES *et al.*, 2007).

A erva-mate ganhou o mercado internacional, sendo exportada para os Estados Unidos, Europa e Ásia, como vegetal ou na forma de extratos para ser utilizada em alimentos funcionais e preparações fitofarmacêuticas (FILIP *et al.*, 2000; FILIP; FERRARO, 2003).

Várias publicações relataram que a erva-mate tem propriedades diuréticas e antioxidantes (FILIP *et al.*, 2000; FILIP; FERRARO, 2003). Ela também pode melhorar o funcionamento do sistema cardiovascular (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005) e atua como um estimulante do sistema nervoso central (VIEIRA *et al.*, 2008). Infusões de erva-mate tem sido propostas como um suplemento dietético para a prevenção de arteriosclerose e doença arterial coronariana (CARINI *et al.*, 1998; HECK; MEJIA, 2007).

O efeito hipoglicêmico da erva-mate foi avaliado por alguns autores tanto *in vitro* (GUGLIUCCI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012) quanto *in vivo* (ARÇARI *et al.*, 2009; KLEIN, 2010; KLEIN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012; JACOB, 2012) que mostraram uma diminuição da taxa de glicose no sangue.

1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos ou polifenóis pertencem à classe de componentes que contêm um anel benzênico, um grupamento carboxílico ligado a um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila. São classificados em dois grupos: derivados de ácido hidroxicinâmico e derivados de ácido hidroxibenzóico (HECK; MEJIA, 2007; PAGLIOSA, 2009).

Os compostos fenólicos mais encontrados nas folhas de erva-mate são o ácido clorogênico e seus isômeros (BASTOS *et al.*, 2007). Estes e o ácido caféico são responsáveis por inúmeros efeitos biológicos da erva-mate como antiglicação (GUGLIUCCI *et al.*, 2009) e capacidade antioxidante, sendo esta também atribuída à presença da rutina e outros flavonóides (HECK; MEJIA, 2007; ANESINI *et al.*, 2012; DEETAE *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos ou polifenóis apresentam uma grande variedade de estruturas e funções, formando uma das principais classes de metabolitos secundários em plantas, que estão intimamente associados à estratégias de defesa das mesmas (ROSS; KASUM, 2002).

As principais classes de polifenóis são definidas de acordo com a natureza de sua estrutura hidrocarbônica e são os ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, antraquinonas e, menos comumente, estilbenos e lignanas (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; EVANS, 2002). Geralmente, a estrutura compreende um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas substituintes, variando desde moléculas fenólicas simples até compostos altamente polimerizados. A maioria dos compostos fenólicos ocorre complexado a carboidratos (mono e polissacarídeos), proteínas e outros componentes vegetais (ROBBINS, 2003).

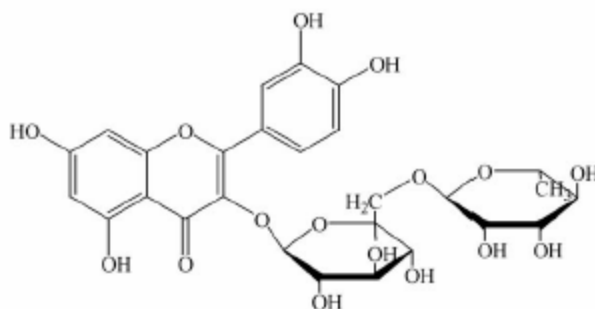
Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas, sendo esta a razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas principais são a rota do ácido malônico e a do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os flavonóides são o maior grupo dos compostos fenólicos encontrados em alimentos. Apresentam estrutura com dois anéis aromáticos, unidos por um anel heterocíclico oxigenado. No grupo dos flavonóides encontram-se flavanóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas, isoflavonas e flavonóis, entre outros, estes

diferem entre si principalmente de acordo com o grau de insaturação e oxidação do anel C (RICE-EVANS *et al*, 1996; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997; AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Na composição química da erva-mate encontramos a rutina que pertence à classe dos flavonóis. Os flavonóis se diferem dos outros flavonóides pela presença do grupo hidroxílico (na posição 3) e do grupo carbonílico (na posição 4), apresentando uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997). A rutina (Figura 3) é constituída pela quercetina associada a um dissacarídeo (6-O- α -L-ramnose-D-glucose) (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA



FONTE: RIZZO *et al.* (2006)

Os ácidos fenólicos são subdivididos em dois grupos: os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico. O ácido 5-cafeoilquínico (ácido quínico esterificado ao ácido caféico) (Figura 4), que é o mais relatado desta classe de compostos. A planta erva-mate apresenta elevada concentração de compostos do grupo do ácido hidroxicinâmico, com destaque para os derivados do ácido caféico: ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (HECK; SCHMALKO; MEJIA, 2008; MARQUES; FARAH, 2009). A estrutura química do ácido caféico está mostrada na Figura 5.

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO

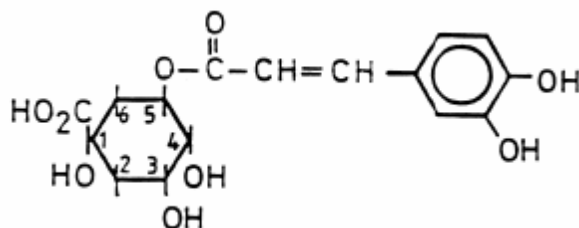
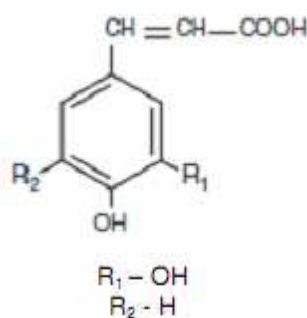
FONTE: DE MARIA *et al.* (1998)

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CAFEÍCO



FONTE: CLIFFORD; SCALBERT (1999)

Os compostos fenólicos não apresentam somente atividades biológicas e farmacológicas, mas também são responsáveis pelas características sensoriais dos alimentos de origem vegetal e em bebidas onde são encontrados (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Os compostos fenólicos ou polifenóis em conjunto com outras substâncias como vitamina C e E, e também carotenóides são capazes de proteger as células contra estresse oxidativo, por isso são conhecidos como antioxidantes (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; VAHER; KHOEL, 2003). Para Sies e Stahl (1995), antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou evita a oxidação desse substrato de maneira efetiva.

O consumo regular de substâncias bioativas com atividade antioxidante capazes de combater radicais livres pode reduzir o risco de doenças crônicas e degenerativas (GUGLIUCCI, 1996; CHENG *et al.*, 2001). Em relação à capacidade antioxidante, os flavonóides são capazes de interferir nas reações de formação e propagação dos radicais livres (TRUEBA, 2003).

Além de sequestrar radicais livres, quelar íons metálicos e inibir oxidases, os flavonóides podem aumentar a disponibilidade de antioxidantes

endógenos, assim como a atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, são capazes de inibir as enzimas envolvidas com a geração de espécies reativas de oxigênio (TRUEBA, 2003).

Estudos mostraram que o consumo de infusões de erva-mate apresentam uma potente atividade antioxidante, maior até que as propriedades da Vitamina C e do BHT (hidroxibutiltolueno) para diminuir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (GUGLIUCCI; STAHL, 1995). Felippi *et al.* (2006) avaliaram o consumo das infusões de erva-mate em camundongos, onde verificaram que a erva-mate reverteu a inibição da contração e do relaxamento vascular verificada nos animais com aterosclerose.

Silva *et al.* (2008) estudaram o efeito da ingestão aguda da infusão de erva-mate (500 mL) em humanos e comprovaram um aumento na proteção antioxidante do plasma e das partículas de LDL, indicando que os compostos químicos presentes na erva-mate são absorvidos e atingem a circulação sanguínea em quantidade suficiente para exercer o seu efeito antioxidante.

De acordo com a literatura, os teores analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em base seca de rutina, ácido caféico e ácido 5-cafeoilquínico encontrados na erva-mate variam de 0,60 a 13,00 mg g⁻¹; 0,14 a 0,55 mg g⁻¹ e 5,70 a 28,00 mg g⁻¹, respectivamente (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; BORTOLUZZI *et al.*, 2006; CARDOSO JÚNIOR *et al.*, 2007, DUTRA, 2009; BERTÉ, 2011).

O consumo de compostos fenólicos, devido ao seu potencial antioxidante, deve ser estimulado através da ingestão de bebidas e produtos à base de erva-mate. Sendo assim, torna-se necessário conhecer os fatores que interferem nestes teores, como localidade e modo de cultivo (DA CROCE, 2002) ou processamento empregado na industrialização (ZANOELO *et al.*, 2006).

Diferentes métodos são empregados para a extração dos compostos fenólicos em erva-mate, podendo ser por infusão aquosa (FILIP *et al.*, 2001), hidrólise ácida (BASTOS *et al.*, 2006), maceração da amostra (CARDOSO JÚNIOR *et al.*, 2007) seguida de ebulição sob refluxo (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; RIBANI, 2006) com solução hidroalcoólica.

A cromatografia líquida tem sido a metodologia mais empregada na análise de compostos fenólicos em erva-mate, utilizando principalmente gradiente da fase móvel para separação de diferentes classes dos componentes

(FILIP *et al.*, 2001; HOFFMANNRIBANI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; MENINI *et al.*, 2007) devido à heterogeneidade nas suas características químicas. Entretanto, como a cromatografia é um método caro e demorado, sendo de difícil implementação para controle rápido durante as etapas do processamento, outros equipamentos, estão em estudo para controle destes teores dentro no processamento industrial, inclusive por meio de análises *online*.

1.3. AMIDO

O amido é um polissacarídeo, considerado como a principal substância de reserva nas plantas, composto por moléculas de amilose e amilopectina. A amilose é constituída por uma cadeia linear onde as moléculas de anidroglicose se unem por ligações alfa-1,4, enquanto que a amilopectina apresenta cadeia ramificada, onde as anidroglicoses estão juntas por ligações alfa-1,4 e alfa-1-6 (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

O amido pode ser obtido de sementes, tubérculos e raízes e apresenta várias aplicações em produtos alimentares como agentes adesivos, ligantes e formadores de filmes, além de atuarem como gelificantes, espessantes, retentores de umidade e retardadores da retrogradação de alguns alimentos (ZOBEL; STEPHEN, 1995; FREITAS *et al.*, 2003).

As propriedades físico-químicas e funcionais dos amidos são influenciados pela organização física e pela proporção entre a amilose e a amilopectina no grânulo (LIN *et al.*, 2016).

O termo ceroso (ou no inglês, *waxy*) refere-se às variedades de amido que são compostos praticamente apenas por amilopectina. O milho ceroso, é um cereal melhorado, sendo cultivado a mais de 100 anos no leste e sudeste asiático. A textura é um dos aspectos mais importantes oferecido pelo milho ceroso no âmbito alimentar (LERTRAT; THONGNARIN, 2008).

O amido de milho comum se caracteriza pela formação de um gel consistente, é bastante utilizado em sopas desidratadas e molhos que requerem viscosidade a quente. Já, para produtos que necessitam de armazenamento sob refrigeração, esse amido não é muito indicado devido à sinérese (exsudação de água), consequência do fenômeno de retrogradação. Nesses casos, é mais indicado o uso do amido de milho ceroso que apresenta maior estabilidade a

baixas temperaturas, pelo fato de praticamente não possuir amilose. Os géis feitos com esse amido são fracos, altamente viscosos no cozimento, claros e coesivos (BAHNASSEY; BREENE, 1994; PARKER; RING, 2001).

Os amidos *high-amilose* gelificam e formam filmes com facilidade devido ao alto conteúdo de amilose. Por isso, esses amidos são usados principalmente em produtos como *nuggets*, aos quais confere crocância e previne a penetração excessiva de óleo durante a fritura. Também são muito utilizados na indústria de balas de gomas, contribuindo com 25-50% do total de amido utilizado nas formulações (COLLONA; LELOUP; BULÉON, 1992).

1.3.1. Amido Modificado

Os amidos nativos apresentam algumas limitações tecnológicas, sendo assim a produção de amidos modificados uma alternativa para aumentar a utilização deste polímero nas aplicações industriais (WURZBURG, 1986; LEONEL; JACKEY; CEREDA, 1998).

As razões que levam à modificação do amido são (BEMILLER, 1997):

- Modificar as características de cozimento (gomificação);
- Diminuir a retrogradação e a tendência das pastas em formarem géis;
- Aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade;
- Melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes;
- Adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante.

A modificação de amidos nativos pode ser realizada por processos físicos, tratamento térmico, exposição a radiações, processos enzimáticos ou processos químicos, como oxidação e esterificação. Estas modificações alteram profundamente a gelatinização dos grânulos de amido nativo, assim como seu comportamento quando na forma de pasta e sua retrogradação (GUILBOT; MERCIER; STARCH, 1985; SCHNITZLER *et al*, 2015; CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015).

Os amidos e seus derivados são utilizados na indústria de alimentos como ingredientes básicos ou aditivos de produtos, com a finalidade de melhorar

o processo de fabricação dos alimentos. Nas indústrias de balas, doces, chocolates, bolo, assim como nas indústrias de geleias e sobremesas são utilizados amidos provindos do processo de hidrólise devido às propriedades higroscópicas, anti-cristalizantes (do açúcar) ou adoçantes. Da mesma forma são utilizados os derivados de processos de isomerização do amido (FRANCO *et al.*, 2002).

1.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

O termo espectroscopia tem sido utilizado para designar métodos analíticos que estudam a interação da radiação eletromagnética com a matéria.

A região do infravermelho (IR) corresponde a região do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e micro-ondas, engloba radiações com comprimentos de onda de 780 a $1,0 \times 10^6$ nm ou número de onda de 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} . O espectro infravermelho pode ser dividido em infravermelho próximo (NIR), médio (MID) e distante (FAR) (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Estas regiões estão mostradas na Tabela 2.

TABELA 2 - REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

| Região | Intervalo de número de onda (cm^{-1}) | Região do comprimento de onda (nm) | Região de frequência (Hz) |
|----------------|--|---|---|
| Próximo (NIR) | 12800 a 4000 | 780 a 2500 | $3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$ |
| Médio (MID) | 4000 a 200 | 2500 a 5000 | $1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$ |
| Distante (FAR) | 200 a 10 | 5000 a 10000 | $6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$ |

FONTE: HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009

Os espectros no IR podem ser obtidos a partir de amostras sólidas, líquidas e gasosas, e a qualidade dos espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessório utilizado para a obtenção dos mesmos. Os métodos mais utilizados são por transmitância e por reflectância, sendo este

muito usado para análises qualitativas e quantitativas. O método por reflectância pode apresentar acessórios para a obtenção de espectros por Reflectância Total Atenuada (ATR), Reflectância Especular e Reflectância Difusa (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Na Tabela 3 são apresentadas as principais aplicações das regiões de espectroscopia IR (HOLLER *et al.*, 2009).

Na região no infravermelho próximo as principais aplicações encontram-se na análise quantitativa e qualitativa de materiais industriais e agrícolas e no controle de processos. A espectroscopia NIR, além de fornecer os resultados de maneira mais rápida, é um método não destrutivo, assim como não gera subprodutos tóxicos e apresenta simplicidade na preparação de amostras, sendo que a maior desvantagem da técnica é, provavelmente, a baixa sensibilidade dos constituintes em menores concentrações (BURNS; CIURCZAK, 2001; SKOOG, HOLLER; NIEMAN, 2002).

TABELA 3 - APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA IR

| Regiões Espectrais | Tipos de Medida | Tipo de Análise | Tipo da amostra |
|---------------------------|------------------------|------------------------|--|
| IR próximo | Reflectância | Quantitativa | Materiais comerciais sólidos ou líquidos |
| | Absorção | Quantitativa | Misturas gasosas |
| IR médio | Absorção | Qualitativa | Sólidos, líquidos ou gases puros |
| | | Quantitativa | Misturas complexas de líquidos, sólidos ou gases |
| | Reflectância | Quantitativa | Misturas complexas de líquidos, sólidos ou gases |
| | Emissão | Qualitativa | Sólidos ou líquidos puros |
| | | Quantitativa | Amostras atmosféricas |
| IR distante | Absorção | Qualitativa | Espécies inorgânicas ou organometálicas puras |

FONTE: HOLLER *et al.*, 2009

As principais aplicações da radiação de infravermelho próximo (NIR) estão nas indústrias agro- alimentícias, farmacêuticas e petroquímicas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

De um modo geral, a radiação no infravermelho quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular. A radiação infravermelha não é

suficientemente energética para causar transições eletrônicas e a absorção desta radiação está muito restrita a espécies moleculares que possuem diferenças de energia pequenas entre vários estados vibracionais e rotacionais. Para absorver radiação infravermelha a molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos (VALDERRAMA, 2005).

O momento dipolar é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre os dois centros de carga. Quando uma molécula que possui essa variação do momento dipolar vibra, uma variação regular em seu momento de dipolo ocorre e surge um campo que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação. Se a frequência da radiação coincidir exatamente com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia efetiva que resulta em uma variação da amplitude da vibração molecular e a consequência é a absorção de radiação. Do mesmo modo, a rotação de moléculas assimétricas em torno dos seus centros de massa resulta em uma variação periódica do dipolo que pode interagir com a radiação. Nenhuma variação efetiva no momento de dipolo ocorre durante a vibração ou rotação de uma molécula homonuclear como O_2 , N_2 ou Cl_2 e, consequentemente, essas substâncias não podem absorver no infravermelho (COATES, 1999; SKOOG HOLLER; NIEMAN, 2002).

A espectroscopia no IR determina grupos funcionais de uma amostra, sendo que cada grupo absorve em frequência ou comprimento de onda característico. Essas frequências apresentam vibrações específicas que podem ser de estiramento ou de deformação, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

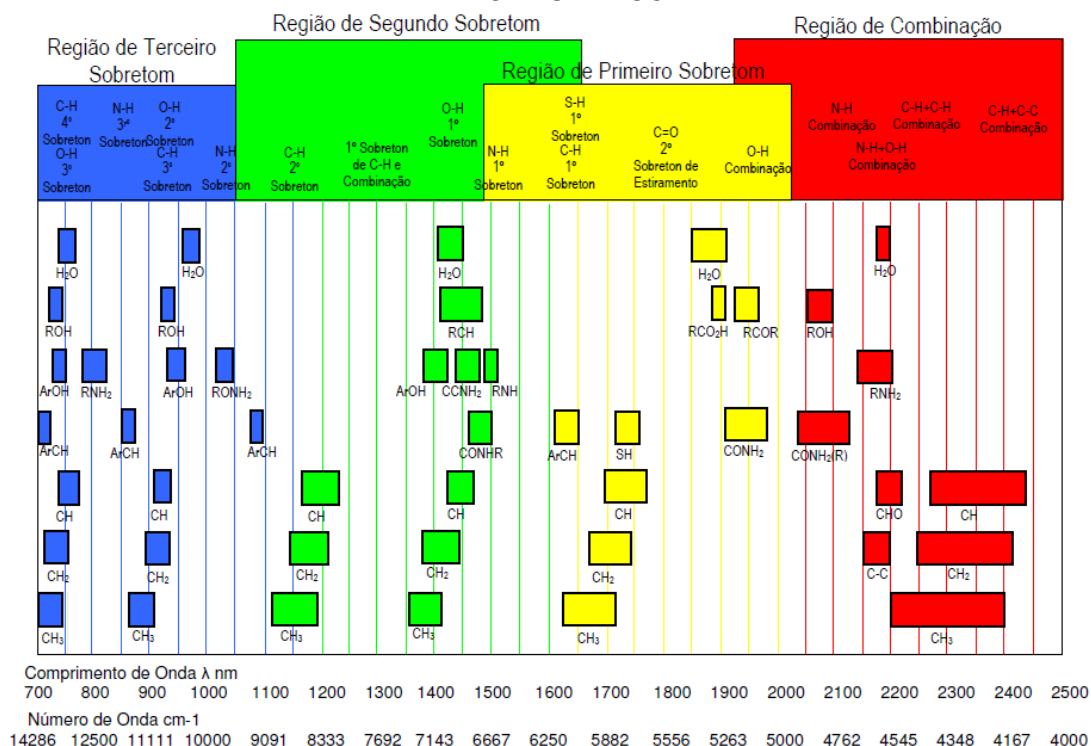
Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, enquanto que as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações podendo acontecer de forma simétrica ou assimétrica e no plano ou fora do plano da molécula. O espectro NIR está associado à anarmonicidade das ligações envolvendo átomos de hidrogênio que conseguem vibrar com maior amplitude devido à sua pequena massa molecular e grande momento de dipolo

quando estão ligados a átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio (COATES, 1999; COSTA FILHO, 2003).

Para a região da espectroscopia vibracional correspondente ao infravermelho próximo, os sinais observados são essencialmente devido à sobretons, bandas de combinação de estiramentos e deformações angulares de transições fundamentais de ligações X-H, em que X representa átomos de oxigênio, nitrogênio, grupos aromáticos e também grupos funcionais importantes como os C-O, grupos carbonila, C-N, C-C, entre outros que sofrem estiramento (WORKMAN, 1996).

O diagrama apresentado na Figura 6 contém as correlações entre a absorção dos grupos funcionais e o comprimento de onda que são observados na região NIR (CHAGAS, 2006).

FIGURA 6 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO (FREQUÊNCIAS DE GRUPOS FUNCIONAIS) NA REGIÃO NIR E A SUA LOCALIZAÇÃO NO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO



FONTE: XIAOBO *et al.*, 2010

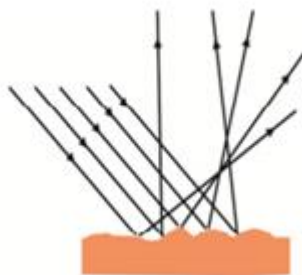
O terceiro sobreton das ligações N-H e C-H, bem como o segundo sobreton das ligações O-H, estão na região acima de 9200 cm⁻¹. O segundo sobreton de estiramento de -CH e vibrações dos grupos -CH₂ e -CH₃ estão localizados na região compreendida entre 9.000 e 8.000 cm⁻¹; a região entre

7.500 e 6.150 cm^{-1} pode ser atribuída ao primeiro sobretom de estiramento de -OH e vibrações; a região próximo de 5.750-5.700 cm^{-1} está relacionada com o primeiro sobretom de estiramento -CH e modos de vibração dos grupos funcionais de -CH₂-CH₃ e -HC=CH-; a região entre 5.350 e 4.550 cm^{-1} , está relacionada com a bandas de combinação de moléculas de água e a região entre 4.370 e 4.260 cm^{-1} pode ser atribuída a combinação de estiramento de -CH e -CH₂ e -CH₃ (BARROS *et al.*, 2009).

A interação da radiação eletromagnética com a matéria pode sofrer diferentes tipos de reflexão, tais como: reflectância difusa, reflectância especular, reflectância interna e reflectância total atenuada. No caso da reflectância difusa, sabe-se que é um processo complexo, onde a radiação penetra na camada superficial das partículas e excita os modos vibracionais das moléculas do composto de interesse e a energia refletida emerge aleatoriamente e espalha-se em todas as direções (Figura 7). A energia refletida difusamente pela amostra carrega informação suficiente, para geração do espectro da amostra na região do infravermelho (MENDHAM *et al.*, 2002).

No caso da espectrometria no Infravermelho de Reflectância Difusa com Transformada de Fourier, obtêm-se diretamente espectros de amostras sólidas com um mínimo de preparo da amostra. Além de poupar tempo no preparo, esta técnica permite que dados espectrais de infravermelho sejam coletados com amostras que não foram alteradas em relação ao seu estado original (HOLLER *et al.*, 2009).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA REFLECTÂNCIA DIFUSA



FONTE: KHOSHESAB (2012)

As técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e no infravermelho médio (MID) estão sendo avaliadas quanto a capacidade de

predição de determinados constituintes em alimentos, como em carnes (PRIETO *et al.*, 2009), linhaça (RIBEIRO *et al.*, 2013), erva-mate (MAZUR *et al.*, 2014^{a,b}) e maracujá (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014) principalmente porque as medidas são rápidas, utilizam pequena quantidade de amostra e, envolvem preparação rápida e simples das amostras. Tanto técnicas de NIR como de MID permitem ainda a determinação simultânea de diferentes parâmetros (CAMPESTRINI, 2005; CEN; HE, 2007), além de serem métodos não destrutivos, limpos, sem uso de reagentes agressivos e nem geração de resíduos (HELFER *et al.*, 2006).

Com o intuito de prever a concentração de uma espécie química presente em uma amostra complexa e heterogênea, tanto o infravermelho próximo quanto o médio empregam o artifício de correlacionar resultados obtidos em laboratório, por meio de técnicas e métodos de referência, com os espectros obtidos nas regiões NIR e/ou MID, por meio da calibração multivariada.

1.5. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A calibração multivariada foi desenvolvida na década de 70 e foi usada primeiramente na região do infravermelho próximo, onde até então era difícil designar bandas para componentes particulares (FERREIRA *et al.*, 1999).

Com o desenvolvimento de técnicas adequadas, mais rápidas e seletivas, os avanços computacionais, principalmente na área da programação e interfaceamento de instrumentos aos computadores, tornou-se possível obter um grande número de variáveis de uma única amostra, produzindo assim uma enorme quantidade de informações (FERREIRA *et al.*, 1999).

A posse desta grande quantidade de dados associada à utilização de ferramentas quimiométricas possibilita extrair informações relevantes mesmo a partir de dados químicos de natureza multivariada. A quimiometria por sua vez, pode ser definida como uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar e/ou selecionar experimentos de forma otimizada, a fim de fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (FERREIRA *et al.*, 1999; ALMEIDA, 2009).

De maneira geral, o procedimento da análise é realizado primeiramente com a aplicação de alguns tratamentos que são utilizados com o objetivo de

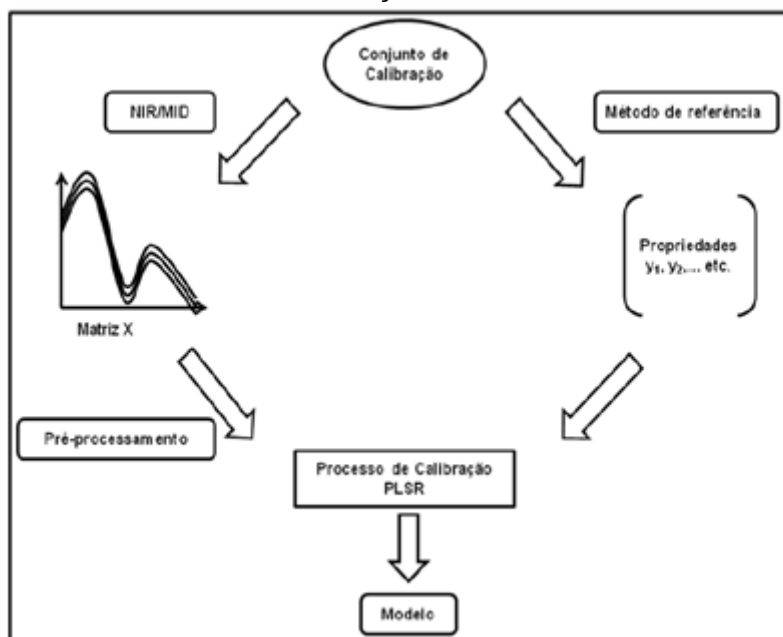
transformar a amostra, levando-a a um estado químico compatível com a técnica analítica disponível. Posteriormente, modelos de calibração são desenvolvidos para obtenção de uma função de regressão que permita prever a quantidade de espécie de interesse, a partir do parâmetro químico medido. Embora o método de calibração univariado seja o mais empregado, esta metodologia subutiliza os dados. A utilização de apenas um parâmetro dificulta, e às vezes até impossibilita a determinação de um constituinte ou constituintes em amostras cujos componentes apresentam interferências espectrais. A calibração multivariada, por sua vez, permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multicomponentes em sistemas mais simples, onde há severa interferência espectral (TOZETTO, 2005).

Duas etapas são importantes na calibração multivariada: a construção do modelo (calibração) e a verificação de sua validade, ou seja, se o modelo construído é ou não realístico (previsão ou validação).

A calibração pode ser definida como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente (BRERETON, 2000).

Para construção do modelo de regressão, inicialmente obtém-se os espectros de um conjunto de amostras e os valores dos parâmetros analisados, determinados por uma técnica analítica de referência. Logo, o desenvolvimento do modelo envolve a determinação das relações entre os espectros NIR e os valores de referência dos parâmetros analisados, conforme diagrama na Figura 8.

FIGURA 8 - DIAGRAMA DE CONSTRUÇÃO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO PLS



FONTE: SOTELO (2006)

O modelo de calibração é uma relação entre X (espectros NIR) e Y (valores de referência). O conjunto de dados de Y representa a informação que se espera que o modelo represente e seja capaz de estimar quando amostras desconhecidas forem analisadas (FERREIRA *et al.*, 1999; SOTELO, 2006).

Resumidamente, o processo de calibração consiste de duas etapas, a modelagem, que estabelece uma relação matemática entre X e Y no conjunto de calibração, e a validação, que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do analito de interesse.

Diversos modelos de calibração multivariada vêm sendo utilizados para a qualificação e quantificação em aplicações NIR, tais como Regressão Linear Múltipla (MLR), Regressão por Componentes Principais (PCR), Análise de Componentes Principais (PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Esses modelos têm apresentado resultados satisfatórios em várias aplicações (BRAGA; POPPI, 2004).

1.5.1. *Análise de Componentes Principais (PCA)*

A análise de componentes principais (PCA) consiste numa transformação da matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”. Sendo assim é possível observar semelhanças e diferenças entre as amostras, para fazer uma verificação inicial de sua homogeneidade e definir um número de componentes principais (SHIN *et al.*, 2010).

A transformação é feita de modo que o conjunto de dados possa ser representado por um número reduzido de novas variáveis chamadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais (FERREIRA *et al.*, 1999).

A PCA decompõe a matriz de dados originais em uma soma de matrizes em que as novas variáveis são obtidas em ordem decrescente de quantidade de informação estatística que descrevem, ou seja, a primeira componente principal aponta a direção de maior variação dos dados, a segunda, que é ortogonal à primeira, aponta a outra direção que descreve a maior variação restante dos dados e assim por diante (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 1999).

A aplicação da PCA propicia a obtenção de duas novas informações, extremamente úteis: os escores e os pesos (*loadings*). Os scores são novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais. Como cada componente principal é construída pela combinação linear das variáveis originais, os *loadings* são os coeficientes desta combinação, ou seja, trata-se do peso que cada variável original contribui para a obtenção do novo sistema de eixos (FERREIRA *et al.*, 1999).

Objetivos adicionais de usos da PCA nos desenvolvimentos dos modelos multivariados são: classificação de grupos específicos e detecção de amostras diferenciadas.

1.5.2. *Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)*

O método de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) é um método de análise multivariado quantitativo considerado eficiente principalmente

por lidar com ruídos experimentais, colinearidade e não linearidade (FERREIRA *et al*, 1999). PLS é um exemplo de método de calibração indireto, pois não exige que os espectros individuais dos constituintes de interesse, nem dos interferentes, sejam conhecidos previamente. Entretanto, requer análise de uma série de amostras de calibração (conjunto de calibração), cuja composição seja conhecida (COATES, 1999)

No modelo PLS as informações espectrais (matriz X) e as informações das concentrações (matriz Y) são usadas ao mesmo tempo correlacionando-as a fim de se obter uma relação linear na fase de calibração. A regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) para a construção do modelo, retira informações do conjunto de dados da matriz espectral (matriz X) para correlacioná-la com as informações retiradas do conjunto de dados de referência (matriz Y). Portanto, o método decompõe as matrizes X e Y em uma soma de produtos de dois vetores (escores, T e U e *loadings* P e Q) para cada um deles representando uma componente principal. Existem vários algoritmos matemáticos para calcular esta decomposição, sendo que o mais utilizado é conhecido por NIPALS (GELADI; KOWALSKI, 1986).

Para a construção do modelo de calibração é usado um número de variáveis latentes que proporcione o menor erro possível de previsão. Na modelagem por mínimos quadrados parciais, tanto a matriz das variáveis independentes (x), como o vetor das variáveis dependentes (y) são representados pelos escores e pesos conforme a Equação 1 (MORGANO *et al.*, 2008):

$$X = TP + E \quad (1)$$

Onde T contém os escores, P contém os pesos, E é a matriz de erros da decomposição de “x”.

Por meio das combinações lineares dos dados espectroscópicos (matriz X) e dos dados de referência (matriz Y), se obtém o número de variáveis latentes (VL) necessários para correlacionar os espectros e as concentrações. É usado para construção do modelo de calibração um número de variáveis latentes que proporcione o menor erro possível de previsão, ou seja, que as diferenças entre os valores de referência e os valores previstos sejam os menores. A seleção do número de VL a serem incluídas no modelo de regressão criado é um ponto

muito importante. O número ideal de VL é aquele que permite o desenvolvimento de um modelo com boa capacidade de previsão para amostras externas. (MARTENS; NAES, 1996).

Após a construção dos modelos de calibração é necessário avaliar a qualidade dos mesmos através da etapa de validação. Esta etapa consiste em testar o modelo, utilizando-o para previsão do teor das amostras a fim de estabelecer se ele de fato irá refletir o comportamento do analito de interesse (FERREIRA *et al.*, 1999).

Pode-se validar um modelo por meio da validação cruzada (*cross validation*), método em que se emprega um conjunto de teste gerado a partir do mesmo conjunto de calibração, ou através da validação externa, onde se utiliza um conjunto de amostras separado e diferente do conjunto de calibração.

A validação cruzada é uma técnica de validação realizada através de diferentes métodos de análise, sendo recomendado o uso do método “*leave one out*” quando se tem um conjunto com poucas amostras. Neste método a primeira amostra dos dados de calibração é eliminada. Em seguida, a calibração é efetuada usando as amostras restantes. Este procedimento é realizado para todas as amostras, sendo armazenado o modelo que revelou melhor desempenho, ou seja, menor erro (NAES *et al.*, 2002). O erro calculado através desta técnica denomina-se RMSECV (Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada – *Root Mean Squared Error of Cross Validation*) (DAGNEW; CROWE; SCHOENAU, 2004).

A validação externa é realizada com a utilização de um conjunto de amostras que não participou da etapa de calibração, sendo determinado a Raiz Quadrada do Erro Médio de Previsão (RMSEP – *Root Mean Squared Error Prediction*) (PASQUINI, 2003).

A presença de amostras *outliers*, ou seja, amostras que apresentam comportamento diferente das demais pode gerar modelos com uma baixa capacidade de previsão. Podem-se utilizar grandezas na detecção de amostras anômalas, entre elas a “*Leverage*” e os Resíduos de “*Student*” (VANDEGINSTE *et al.*, 1998).

A *leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de *leverage* pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração. Por outro lado, se as

medidas experimentais de uma amostra são diferentes das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma alta influência no modelo, que pode ser negativa. Em geral, estas amostras solitárias estão visíveis no gráfico de scores. A *leverage* pode ser interpretada geometricamente como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados e é calculada segundo a Equação 2 (FERREIRA *et al.*, 1999).

$$\text{Limite de } leverage = 3 \cdot VL/n \quad (2)$$

Onde VL representa o número de variáveis latentes do modelo e n o número de amostras.

Os resíduos Student indicam se a amostra está dentro de uma distribuição normal com um nível de confiança de 95%, assumindo valores de limite de $\pm 2,5$ (FERREIRA *et al.*, 1999).

1.5.3. Pré – Processamentos Espectrais

Os espectros adquiridos no infravermelho geralmente apresentam algum tipo de problema em relação ao deslocamento da linha base, presença de ruídos, dispersão da luz em amostras sólidas, variações no caminho óptico, variação de temperatura durante a realização das análises, entre outros. Os pré-processamentos espectrais são aplicados antes da etapa de calibração e são utilizados para melhorar a eficiência dos modelos de calibração multivariada, através da eliminação dos problemas citados. O pré-processamento dos dados espectrais permite reduzir, eliminar ou padronizar o impacto destas fontes de variação nos espectros, sem alterar a informação contida neles. Existem vários procedimentos matemáticos relatados na literatura como por exemplo: dados centrados na média, correção multiplicativa de sinal (MSC), alisamento, cálculo da derivada e outros (MARTENS; NAES, 1996; SIESLER *et al.*, 2002).

Os pré-processamentos utilizados em amostras sólidas moídas são definidos a seguir:

a) Correção Multiplicativa do Sinal – MSC

Durante a aquisição dos espectros por técnicas de reflexão, podem ocorrer fenômenos como espalhamento da luz, devido à não homogeneidade da amostra (diferenças de granulometria, geometria e empacotamento da amostra). A Correção multiplicativa do sinal (MSC) foi desenvolvida e é aplicada para corrigir irregularidades nos espectros de infravermelho de refletância difusa, relacionada ao espalhamento de luz provocado por irregularidades em amostras sólidas, a fim de linearizar os dados espectrais e minimizar fontes de variabilidade não informativas (MORGANO *et al.*, 2005; OZAKI *et al.*, 2007; HARRIS, 2008).

b) Dados Centrado na Média

O cálculo da centralização na média, garante que todos os resultados sejam interpretados em termos de variação em torno da média, ou seja, previne que pontos mais distantes do centro dos dados tenham maior influência que os mais próximos. Desta forma, impede que a magnitude das variáveis afete os cálculos (THOMAS, 1994; FERREIRA *et al.*, 1999; OZAKI *et al.*, 2007).

c) Alisamento

O alisamento tem por finalidade reduzir os ruídos espectrais, através da utilização do algoritmo de Savitzky-Golay. O ruído aleatório que acompanha o sinal analítico, provém de variações imprevisíveis como vibrações, correntes de ar, movimento aleatório das moléculas e outros (O'HAYER, 2001). A aplicação da técnica de alisamento visa reduzir matematicamente o ruído instrumental, aproximadamente, pela raiz quadrada do número de pontos utilizados (BROAD *et al.*, 2001)

d) Cálculo da Derivada

O cálculo da primeira e segunda derivada, quando empregado a dados espectrais, gera mudanças na informação processada, podendo ter efeito

positivo, ao evidenciar um sinal analítico de interesse, ou ter efeito negativo, ao acentuar ruídos instrumentais (SAUER, 2007). O cálculo da derivada permite corrigir deslocamentos da linha de base (CHAMINADE *et al.*, 1998) e melhorar a separação de sinais não totalmente sobrepostos.

e) Variação de Padrão Normal - SNV

A variação de padrão normal (*Standard Normal Variate* – SNV) é utilizada para minimizar interferências causadas pelo tamanho de partículas e diferenças de densidade das amostras (NAES *et al.*, 2002). Este pré-processamento tem características similares às descritas pelo MSC.

f) *Detrend*

Detrend é aplicado no espectro para remover efeitos de deslocamento de linha de base. O método consiste em modelar a linha de base em função do comprimento de onda com um polinômio de segundo grau ou grau superior e sua função é então subtraída de cada espectro independentemente (LUYPAERT *et al.*, 2002).

1.6. MÉTODOS TERMOANALÍTICOS

A utilização dos métodos termoanalíticos iniciou-se a partir da observação do homem de como o fogo agia sobre os materiais. Atualmente a instrumentação termoanalítica atingiu um grau de sofisticação muito elevado devido ao progresso da ciência e tecnologia (IONASHIRO, 2005).

A análise térmica é o termo que se refere ao conjunto de técnicas que permite avaliar as mudanças de uma propriedade física ou química de uma substância ou material em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (GIOLITO, 1987).

As vantagens da análise térmica envolvem a necessidade de uma pequena quantidade de amostra para os ensaios, variedade de resultados em um único gráfico, sem necessidade de preparo da amostra. A análise térmica

pode ser aplicada em diversas áreas como alimentícia, catálise, cerâmica, farmacêutica, dentre outras. Mas há algumas desvantagens, como custo relativamente alto dos equipamentos e ser uma técnica destrutiva para a amostra (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Nos sistemas termoanalíticos a amostra é colocada em um ambiente cuja temperatura é controlada por um dispositivo programador e suas alterações são monitoradas através de um transdutor adequado que produz um sinal de saída análogo à transformação ocorrida. Este sinal de saída após a amplificação adequada é aplicado a um dispositivo de leitura em um registrador (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

As técnicas mais amplamente difundidas e utilizadas são: termogravimetria (TG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; IONASHIRO, 2005).

As técnicas termoanalíticas vêm sendo muito utilizadas na área alimentícia para a caracterização de amidos nativos, caracterização de hidrólise enzimática e também na desnaturação de proteínas (LACERDA, 2008; BICUDO, 2009; COLOMBO; RIBOTTA; LEON, 2010; CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015; SCHNITZLER *et al*, 2015).

1.6.1. Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

A termogravimetria ou análise termogravimétrica baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física ou química (sublimação, evaporação, condensação, oxidação, decomposição, reações no estado sólido) em função do tempo ou da temperatura (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002, PEREIRA *et al.*, 2009).

O aparelho utilizado para a técnica é chamado “Termobalança” (associação entre uma balança e um forno) e para que se tenham resultados, é preciso que se originem produtos de decomposição térmica voláteis, ou que ocorra incorporação de átomos ou moléculas, provenientes dos gases da atmosfera do forno, respectivamente aumentando ou diminuindo a massa original da amostra (CAVALHEIRO *et al.*, 1995; SKOOG, HOLLER; NIEMAN, 2001).

A técnica TG é essencialmente aplicável quando se deseja acompanhar variações de massa envolvidas num experimento, sendo seus resultados fundamentalmente de ordem quantitativa (CAVALHEIRO *et al.*, 1995).

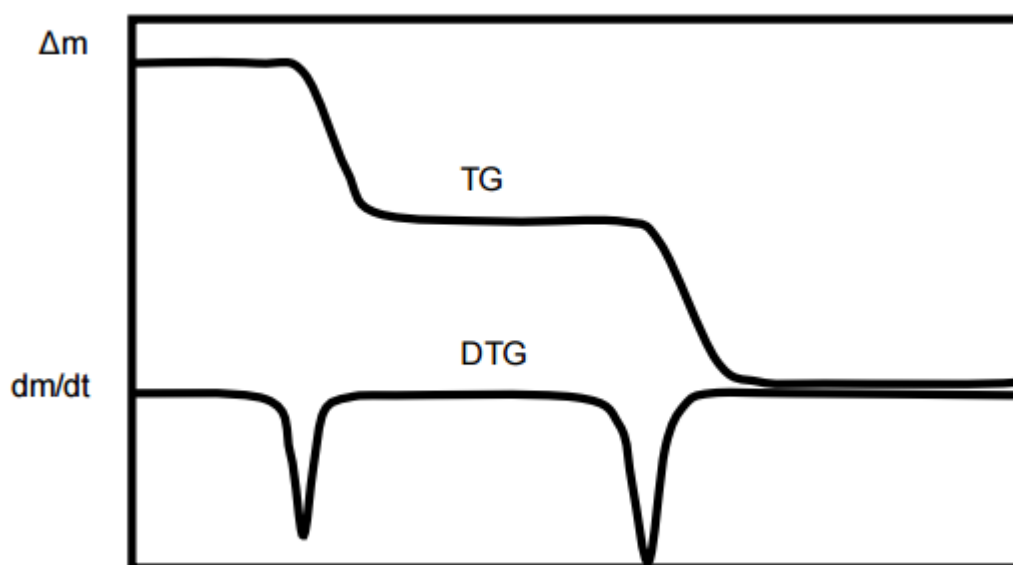
Através da termogravimetria é possível conhecer as alterações causadas pelo aquecimento na massa das amostras, de forma detalhada, e ainda estabelecer uma faixa de temperatura em que as mesmas adquirem composição química definida ou sofrem decomposição. As curvas TG podem ser (CAVALHEIRO *et al.*, 1995; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002):

- Isotérmicas: a variação de massa da amostra pode ser registrada como uma função do tempo a uma temperatura constante;
- Semi-isotérmica: a amostra é aquecida até uma massa constante a cada série de aumento de temperatura;
- Dinâmica: a amostra é aquecida em um ambiente no qual a variação de temperatura está programada ou pré-determinada, preferencialmente de forma linear.

Os resultados de uma medida TG podem ser afetados por fatores instrumentais e pelas características da amostra (CAVALHEIRO *et al.*, 1995; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). Os fatores instrumentais são: atmosfera do forno, composição do conteúdo da amostra, geometria do forno e do amostrador; razão de aquecimento, sensibilidade do mecanismo de registro (GIOLITO; IONASHIRO, 1988; CAVALHEIRO *et al.*, 1995; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). As interferências nos resultados do TG em relação às características das amostras são devido a: calor de reação; condutividade térmica, empacotamento da amostra e natureza da mesma, quantidade de amostra, solubilidade de gás desprendido na amostra, tamanho de partícula (CAVALHEIRO *et al.*, 1995; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

As curvas TG permitem obter conclusões sobre a estabilidade térmica da amostra, sobre a composição e estabilidade dos compostos intermediários, sendo entre as técnicas termoanalíticas, a mais utilizada (WENDLANDT, 1986). A representação da variação de massa em função da temperatura e/ou tempo é a curva termogravimétrica ou curva TG, conforme ilustrado na Figura 9.

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DE UMA CURVA TG-DTG



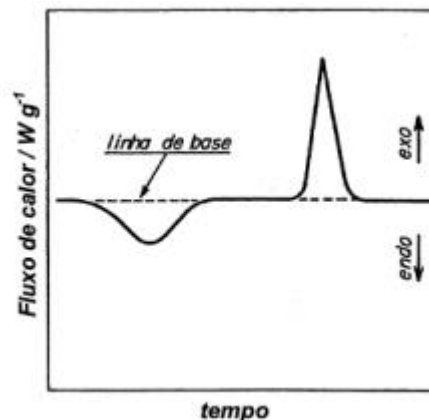
FONTE: Adaptado de CARVALHO FILHO (2000)

A termogravimetria derivada (DTG), representada na Figura 9, é um recurso matemático capaz de fornecer a primeira derivada da curva TG em função da temperatura ou tempo, sendo o registro desta técnica a curva termogravimétrica derivada ou curva DTG (WENDLANDT, 1986).

1.6.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica derivada da análise térmica diferencial (DTA). Esta técnica mede a diferença de energia necessária a uma substância e a um material de referência, inerte de modo térmico, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura, de maneira que a amostra e a referência sejam mantidas em condições isotérmicas, uma em relação a outra, independente do evento térmico que esteja ocorrendo na amostra (WENDLANDT, 1986; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2001; IONASHIRO, 2005). Na Figura 10 está representada uma curva DSC.

FIGURA 10 - CURVA GENÉRICA PARA ANÁLISE DE DSC.

FONTE: BERNAL *et al.*, 2002.

O DSC pode ser definido como uma técnica que mede as temperaturas e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças químicas ou físicas que envolvem processos endotérmicos, exotérmicos ou mudanças na capacidade calorífica (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

A técnica DSC pode ser utilizada para fornecer informações sobre caracterização e medidas específicas tais como: transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização, ponto de fusão e calor específico, oxidação, pureza, estabilidade térmica, ponto de ebulição, grau de velocidade de cura, cinética de reação e outros (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; IONASHIRO, 2005).

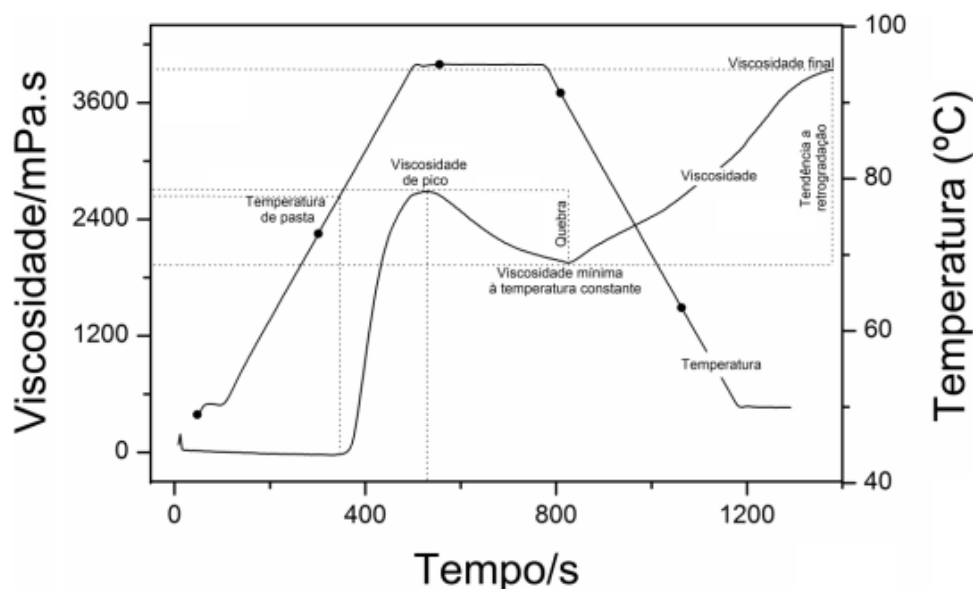
O DSC apresenta como vantagens: rápido tempo de análise; fácil preparo da amostra; pode ser aplicado para sólidos e líquidos; larga faixa de temperatura (variando de -180°C a 1750°C para alguns equipamentos) e pode ser utilizado para medidas quantitativas. Já as desvantagens desta técnica são a redução da sensibilidade quando a linha base está em inclinação ou curvatura, sendo que para aumentar a sensibilidade necessita elevar as razões de aquecimento (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

1.6.3. Propriedades De Pasta

As variações de viscosidade de suspensões amiláceas, que ocorrem durante o processo de aquecimento, são avaliadas com o auxílio de viscosímetros rotacionais especiais, os viscoamilógrafos, como o RVA (Rápido Viscoanalisador, fabricado pela Newport Scientific). As propriedades de pasta de amidos obtidos pelo RVA são viscosidade de pico, tempo para atingir este pico, viscosidade final, quebra e temperatura de pasta (ZORTÉA *et al.*, 2011).

A Figura 11 mostra uma curva característica de empastamento. Os parâmetros fornecidos pelo RVA normalmente são: temperatura de pasta que corresponde ao ponto onde a formação da curva é iniciada; viscosidade de pico, obtida durante o ciclo de aquecimento, sendo o valor máximo de viscosidade; quebra que é a diferença de viscosidade entre o pico máximo e a viscosidade mínima a 95°C; Viscosidade final, obtida na temperatura final de resfriamento; e retrogradação, diferença entre a viscosidade mínima e a viscosidade final (ORO *et al.*, 2013).

FIGURA 11 - CURVA TÍPICA OBTIDA EM ANÁLISE NO RVA, APRESENTANDO OS PARÂMETROS QUANTIFICADOS PARA PROPRIEDADE DE PASTA.



FONTE: CORDOBA, 2015

A avaliação da propriedade de pasta por meio do RVA vêm sendo muito utilizado para avaliar a retrogradação de amidos modificados, como amido de

pinhão (CORDOBA; BET; SCHNITZLER, 2015) e amido de milho ceroso (OLIVEIRA *et al*, 2014).

CAPÍTULO II

APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ERVA- MATE

RESUMO

A espectroscopia de infravermelho próximo em conjunto com a calibração multivariada foram utilizadas com o objetivo de determinar o teor de compostos fenólicos (Rutina, Ácido Cafeico (AC), Ácido 5- cafeoilquínico (5-CQA) e Conteúdo fenólico total) em amostras de erva-mate. Um total de 42 amostras dos municípios de São Mateus do Sul, São João do Triunfo, Cruz Machado, Mallet e Imbituva, das safras 2013 e 2014 foram submetidas a um processo de extração e posterior quantificação por HPLC. Os teores encontrados variaram de 2,50 e 4,01 mg g⁻¹ para a rutina, 12,324 e 14,892 mg g⁻¹ para o ácido 5-CQA, 0,21 e 1,37 mg g⁻¹ para o ácido caféico e 16,282 e 19,303 mg g⁻¹ para conteúdo fenólico total. Os modelos de calibração foram desenvolvidos por meio do método PLS. Os modelos desenvolvidos para prever os teores de ácido caféico não apresentaram resultados satisfatórios onde o menor erro de previsão encontrado foi de 18,31%. Os modelos para Rutina, Ácido 5-CQA e conteúdo fenólico total apresentaram erros médios de 12,02% (com 5 variáveis latentes, R² 0,820), 5,38 % (com 6 variáveis latentes, R² 0,891) e 3,44 % (com 4 variáveis latentes, R² 0,918), respectivamente, na etapa de validação externa. Os resultados mostraram que o NIR associado a calibração multivariada podem ser utilizados para a determinação de Rutina, ácido 5-CQA e conteúdo fenólico total em erva-mate.

2.1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é nativa da América do Sul, sendo cultivada na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (MAZUCHOWSKI, 1989; FILIP; FERRARO, 2003). A erva-mate pode ser consumida basicamente de três formas, na forma de chimarrão, tererê ou chá. O consumo de chimarrão é a forma mais tradicional, e é feito através da adição de água quente (RAMALLO *et al*, 1998).

Além do consumo de erva-mate em bebidas estimulantes, esta vem sendo muito empregada na indústria alimentícia, de cosméticos, bebidas, farmacêuticas devido à diversidade de compostos fitoquímicos presente na erva-mate (JACQUES *et al.*, 2007).

A erva-mate apresenta em sua composição química diferentes grupos químicos, como saponinas, alcalóides, compostos fenólicos e óleos essenciais, além das vitaminas A, C, B1, B2, B6, minerais como magnésio, ferro, fósforo, potássio, zinco e sódio (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; ALONSO, 1998; HEINRICHS; MALAVOLTA, 2001).

Atualmente as indústrias ervateiras vêm tentando preservar os compostos fitoquímicos presentes nas folhas de erva-mate, bem como preservar as características sensoriais do produto. Sendo assim, vem se buscando melhorias nas etapas de processamento já usadas e investindo também em novas tecnologias, principalmente nas etapas de sapeco e secagem (SCHMALKO; ALZAMORA, 2005; SCHMALKO; MORAWICKI; RAMALLO, 1997; ZANOELO; ABITANTE; MELEIRO, 2008).

Várias publicações relataram que a erva-mate tem propriedades diuréticas e antioxidantes (FILIP *et al.*, 2000; FILIP; FERRARO, 2003). Ela também pode melhorar o funcionamento do sistema cardiovascular (SCHINELLA *et al.*, 2005) e atua como um estimulante do sistema nervoso central (GONZALES *et al.*, 1993). Infusões de erva-mate tem sido propostas como um suplemento dietético para a prevenção de arteriosclerose e doença arterial coronariana (CARINI *et al.*, 1998; HECK; GONZÁLEZ DE MEJIA, 2007). O efeito hipoglicêmico da erva-mate foi avaliado por alguns autores tanto *in vitro* (GUGLIUCCI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012) quanto *in vivo* (ARÇARI *et al.*, 2009; KLEIN, 2010; KLEIN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012).

Normalmente a determinação de compostos fenólicos é realizada por cromatografia líquida, sendo esta uma técnica eficiente porém que demanda do uso de equipamentos caros e sofisticados e grande quantidade de reagentes (BERTÉ *et al.*, 2011). A espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) pode ser uma alternativa simples, rápida e não destrutiva para substituir a análise química clássica. O NIR determina a interação da luz com a amostra, através de vibrações moleculares das ligações dos constituintes químicos (PASQUINI, 2003).

O NIR foi usado por Cozzolino e colaboradores (2010) para classificar amostras de erva-mate de acordo com sua origem geográfica. Esta técnica também foi testada e validada para controle de umidade de amostras de erva-mate (MAZUR *et al.*, 2014^a), determinação de metilxantinas totais em erva-mate

(MAZUR *et al.*, 2014^b) e determinação de compostos fenólicos totais (FRIZON *et al.*, 2015). Porém, não foi encontrado nenhuma pesquisa na literatura que avaliasse a capacidade de previsão dos teores individuais de Rutina, ácido caféico e ácido 5-CQA em amostras de erva-mate.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a espectroscopia de infravermelho próxima associado a calibração multivariada para desenvolver modelos para determinar os teores de rutina, ácido caféico, ácido 5-CQA e conteúdo fenólico total (sendo estes, a soma dos teores individuais obtidos por HPLC).

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. AMOSTRAS

Foram analisadas 42 amostras providas de diferentes municípios do Paraná (São Mateus do Sul, São João do Triunfo, Cruz Machado, Mallet e Imbituva) das safras 2013 e 2014. As amostras coletadas passaram por um processo de beneficiamento tradicional na Ervateira Baldo, localizada em São Mateus do Sul.

2.2.2. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A extração e determinação dos compostos fenólicos da erva-mate foi realizada de acordo com Dutra e colaboradores (2010) e Hoffmann-Ribani (2006). Consistiu em adicionar 100 mL de solução água:etanol 1:1 (v/v) em 2 g de erva-mate, sendo mantida por 12 horas, a temperatura ambiente. Seguiram-se três extrações com 25 mL da solução hidro-etanólica a 50% sob refluxo por 30 minutos cada. As amostras retiradas das extrações foram reunidas em um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água destilada. Estes foram filtrados em membrana filtrante (PTFE) com poros de 0,45 µm da Millipore e encaminhados para análises. As extrações e posteriores análises foram realizadas em triplicata Estes foram filtrados em membrana filtrante (PTFE) com

poros de 0,45 μm da Millipore. As extrações e posterior análises foram realizadas em triplicata.

2.2.3. QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC

A determinação da Rutina (Ru), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e ácido caféico (AC) foi realizada por HPLC, conduzida em um Cromatógrafo a Líquido da marca Agilent, modelo 1200, controlado pelo Software EZ Chrom Elite, com sistema automático de injeção (ALS), detector de arranjo de diodos (DAD). A coluna em uso foi a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm). A eluição em gradiente teve como fase móvel solvente A, água/ácido fórmico (99,55:0,45 v/v) e solvente B, metanol/ácido fórmico (99,55:0,45 v/v). A programação do gradiente foi a seguinte: iniciou-se com 80%A:20%B mantido até 5 min passando para 58%A:42%B em 7 min retornando a 80%A:20%B em 16 min mantida até o final de 20 min de corrida cromatográfica. A detecção foi monitorada em 325 nm para o ácido caféico e 5-CQA e 370 nm para rutina. O conteúdo fenólico total (CFT) foi obtido pela soma dos teores individuais de rutina, ácido caféico e ácido 5-CQA, que foram determinados por HPLC.

2.2.4. ESPECTROSCOPIA NIR

Os espectros de reflectância na região do infravermelho próximo foram coletados em um espectrômetro BRUKER – TENSOR 37, equipado com um acessório de reflectância difusa, sendo os sinais expressos em $\log(1/R)$. Os espectros das amostras foram obtidos em triplicata, por meio de esfera de integração com resolução de 4 cm^{-1} , 64 varreduras para cada espectro e a região espectral sendo de 4000-10000 cm^{-1} .

2.2.5. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO

Modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos para correlacionar os dados espectrais por NIR com os teores analíticos de Rutina.

Ácido Caféico, Ácido 5-CQA e conteúdo fenólico total (CFT) das amostras de erva-mate.

Na construção dos modelos por calibração multivariada foi utilizado o método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), utilizando o pacote PLS-toolbox 1.5 (Eigenvector Research Inc.), trabalhando em ambiente Matlab versão 7.0 (Mathworks Inc.), aplicando o algoritmo NIPALS e validação cruzada *leave on out*.

A montagem das matrizes de dados e análise estatística foi realizada com o software Origin 8.0®.

Inicialmente foi realizado um PCA com os dados espectrais para montagem dos conjuntos de calibração e validação.

Após a determinação do conjunto de calibração, vários modelos foram desenvolvidos e em cada um foram testados diferentes pré-processamentos, como: derivação, alisamento, correção multiplicativa do sinal (MSC), dados centrados na média, variação do padrão normal (SNV).

A análise de amostras *outlier* ou anômalas foi realizada em cada um dos modelos, por meio da análise do número de *Leverage* e Resíduos de Student.

A escolha dos melhores modelos de calibração ocorreu pela análise dos valores de RMSECV, RMSEP e R^2 . Após a determinação do modelo de calibração adequado este foi testado para as amostras do conjunto de validação.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

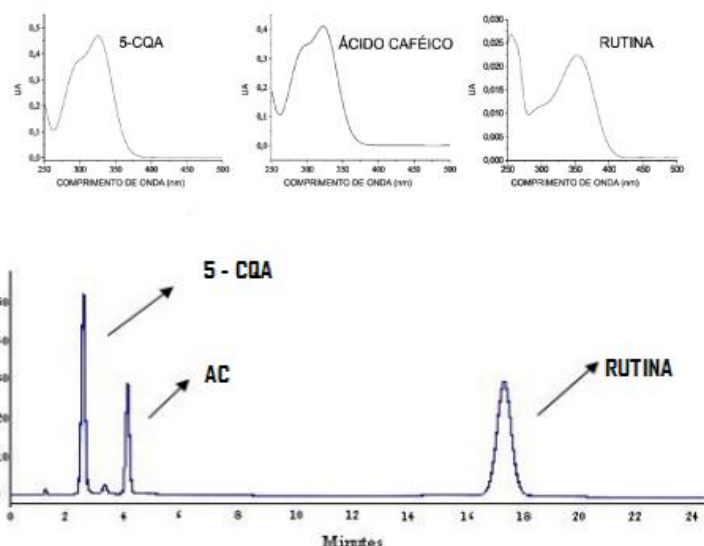
Os teores de compostos fenólicos encontrados nas 42 amostras de erva-mate analisados por HPLC variaram entre 2,50 e 4,01 mg g⁻¹ para a rutina, para o ácido 5-CQA os teores variaram entre 12,324 e 14,892 mg g⁻¹. Os teores encontrados para o ácido caféico variam entre 0,21 e 1,37 mg g⁻¹. Em relação aos teores de Conteúdo fenólico total, foram encontrados variações entre 16,282 e 19,303 mg g⁻¹. Os resultados encontrados estão dentro dos valores relatados por outros autores (HOFFMANN-RIBANI, 2006; DUTRA *et al*, 2010; BERTÉ, 2011). Os valores das concentrações dos compostos fenólicos nas amostras analisadas estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO (mg g⁻¹) DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE QUANTIFICADOS POR HPLC

| AMOSTRA | ORIGEM | ANO | 5 - CQA | RUTINA | AC | CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL |
|---------|---------------------|------|---------|--------|------|-------------------------|
| 1 | São Mateus do Sul | 2014 | 13,34 | 2,81 | 0,46 | 16,62 |
| 2 | São Mateus do Sul | 2014 | 13,25 | 2,96 | 0,21 | 16,68 |
| 3 | São Mateus do Sul | 2014 | 14,32 | 3,36 | 1,09 | 18,77 |
| 4 | São Mateus do Sul | 2014 | 12,82 | 3,83 | 0,87 | 17,51 |
| 5 | São Mateus do Sul | 2014 | 14,24 | 3,02 | 0,56 | 17,81 |
| 6 | São João do Triunfo | 2014 | 13,75 | 3,53 | 1,27 | 18,56 |
| 7 | São João do Triunfo | 2014 | 13,29 | 3,71 | 1,32 | 18,32 |
| 8 | São João do Triunfo | 2014 | 12,75 | 3,14 | 0,70 | 16,59 |
| 9 | São João do Triunfo | 2014 | 13,61 | 2,95 | 1,36 | 17,92 |
| 10 | Cruz Machado | 2014 | 13,38 | 3,28 | 1,37 | 18,03 |
| 11 | Cruz Machado | 2014 | 13,25 | 3,37 | 1,27 | 17,89 |
| 12 | Imbituva | 2014 | 12,32 | 3,14 | 1,30 | 16,79 |
| 13 | Imbituva | 2014 | 12,81 | 3,45 | 1,33 | 17,59 |
| 14 | Mallet | 2014 | 13,28 | 3,70 | 1,05 | 18,03 |
| 15 | Mallet | 2014 | 13,31 | 3,41 | 0,90 | 17,60 |
| 16 | São Mateus do Sul | 2013 | 13,55 | 3,25 | 0,65 | 17,45 |
| 17 | Mallet | 2014 | 13,53 | 3,58 | 0,98 | 18,09 |
| 18 | São Mateus do Sul | 2013 | 12,71 | 3,46 | 0,93 | 17,09 |
| 19 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,89 | 3,63 | 0,78 | 19,30 |
| 20 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,68 | 3,49 | 0,69 | 18,86 |
| 21 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,03 | 2,90 | 0,67 | 17,60 |
| 22 | São Mateus do Sul | 2014 | 13,25 | 2,51 | 0,72 | 16,48 |
| 23 | São Mateus do Sul | 2014 | 13,34 | 2,73 | 0,21 | 16,28 |
| 24 | São Mateus do Sul | 2014 | 14,19 | 3,48 | 1,09 | 18,76 |
| 25 | São Mateus do Sul | 2014 | 12,81 | 3,47 | 0,87 | 17,15 |
| 26 | São Mateus do Sul | 2014 | 14,09 | 4,01 | 0,42 | 18,52 |
| 27 | São João do Triunfo | 2014 | 13,95 | 3,92 | 1,19 | 19,05 |
| 28 | São João do Triunfo | 2014 | 13,19 | 3,49 | 1,32 | 18,01 |
| 29 | São João do Triunfo | 2014 | 13,04 | 3,07 | 0,53 | 16,64 |
| 30 | São João do Triunfo | 2014 | 13,91 | 3,12 | 1,29 | 18,32 |
| 31 | Cruz Machado | 2014 | 13,57 | 3,46 | 1,35 | 18,38 |
| 32 | Cruz Machado | 2014 | 13,36 | 3,25 | 1,33 | 17,93 |
| 33 | Imbituva | 2014 | 12,90 | 3,61 | 1,26 | 17,78 |
| 34 | Imbituva | 2014 | 12,69 | 2,98 | 1,09 | 16,75 |
| 35 | Mallet | 2014 | 13,55 | 3,50 | 1,28 | 18,33 |
| 36 | Mallet | 2014 | 13,54 | 3,56 | 0,89 | 17,87 |
| 37 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,31 | 3,12 | 0,73 | 18,17 |
| 38 | Mallet | 2014 | 13,35 | 3,29 | 0,89 | 17,53 |
| 39 | São Mateus do Sul | 2013 | 12,55 | 3,72 | 0,75 | 17,03 |
| 40 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,57 | 3,56 | 0,82 | 18,96 |
| 41 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,83 | 3,17 | 0,81 | 18,81 |
| 42 | São Mateus do Sul | 2013 | 14,07 | 2,93 | 0,67 | 17,67 |

Na Figura 12 está apresentado um cromatograma da separação dos padrões dos compostos fenólicos analisados.

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS FENOLICOS 5- CQA, AC E RUTINA E RESPECTIVOS ESPECTROS.



Comparando os tempos de retenção para os picos encontrados na separação das amostras de erva-mate com os picos dos padrões e dos espectros obtidos, confirmou-se a seletividade e a separação dos compostos fenólicos nas amostras.

As curvas analíticas dos padrões de Rutina, AC e 5-CQA apresentaram linearidade nas faixas de concentrações determinadas conforme apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ANALISADOS

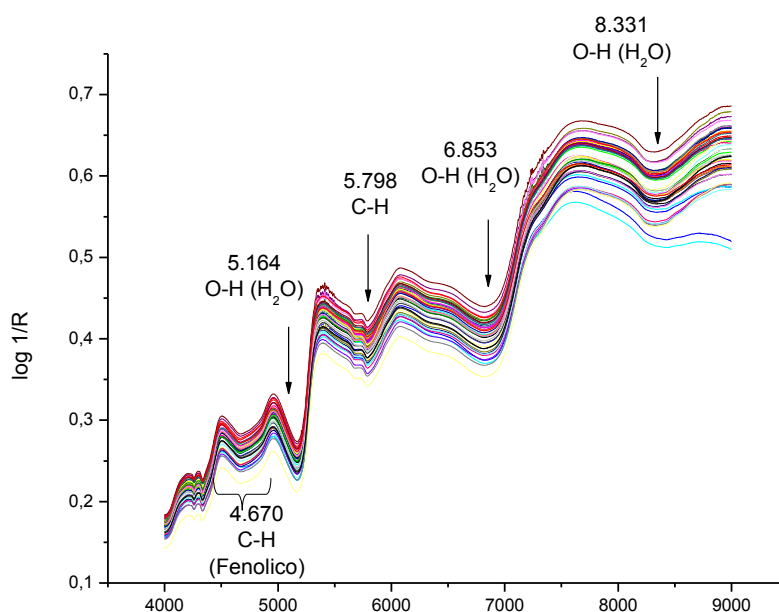
| COMPOSTOS | FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (R^2) |
|----------------|---|---------------------------------------|
| Rutina | 5 – 100 | 0,9997 |
| Ácido Cafólico | 1 – 20 | 0,9950 |
| Ácido 5-CQA | 10 – 150 | 0,9980 |

2.3.2. ESPECTROSCOPIA NIR

Os espectros obtidos na região do infravermelho próximo das amostras de erva-mate, sem tratamento matemático, estão apresentados na Figura 13, onde é possível verificar que as amostras apresentam espectros de perfil semelhante. Devido à complexidade da matriz analisada, os sinais analíticos apresentam sobreposições. A sobreposição de sinais dificulta a atribuição de uma determinada banda a uma única função química exclusivamente.

Para uma melhor interpretação dos espectros NIR foram utilizadas técnicas de calibração multivariada para a análises dos dados extraídos dos espectros, como o PCA e o PLS, possibilitando a análise de todo o espectro para a construção dos modelos de calibração.

FIGURA 13 - ESPECTROS DAS 42 AMOSTRAS DE ERVA-MATE EM DUPLICATA, COLETADOS NO ESPECTRÔMETRO BRUKER – TENSOR 37, EQUIPADO COM UM ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA DIFUSA.



2.3.3. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

2.3.3.1. Análise dos componentes principais – PCA

Os espectros NIR das amostras de erva-mate foram coletados no intervalo de comprimento de onda de 10000 a 4000 cm^{-1} e submetidos a uma análise de componentes principais (PCA). Diferentes pré-processamentos foram aplicados, buscando obter alguma separação ou identificação de grupos específicos, ou seja, observar se as amostras de diferentes municípios e safras apresentavam diferenças na composição química entre si.

No desenvolvimento do PCA foi aplicado o pré-processamento SNV (Transformação Padrão Normal de Variação), utilizado para minimizar interferências causadas pelo tamanho de partículas e diferenças de densidade das amostras (NAES *et al.*, 2002). O pré-processamento Dados Centrado na Média (DCM) foi aplicado também para facilitar a visualização dos dados (NICOLAI *et al.*, 2007).

Analisando a PCA apresentado na Figura 14, foi verificado que a maioria das triplicatas das amostras de erva-mate estão próximas, mostrando boa repetibilidade da análise.

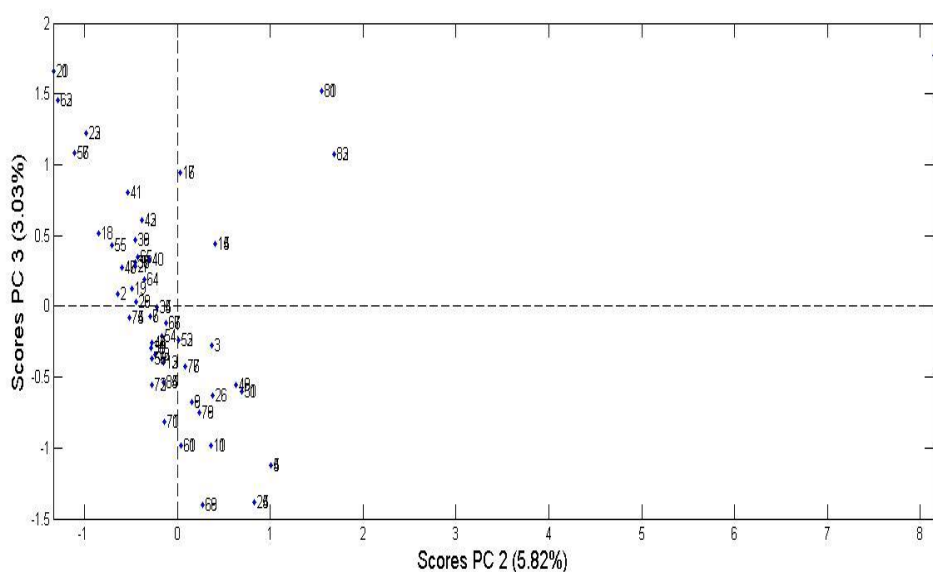


FIGURA 14 - PCA DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE EM UM INTERVALO DE ONDA DE 4000 A 10000 CM^{-1} .

A grande maioria das informações contidas nos espectros das amostras (89,94%) foram explicadas pela primeira componente principal (PC1), sendo que os detalhes da análise são explicados a partir da segunda componente principal (PC2). A análise não revelou, independente da safra e da procedência, diferenças entre as amostras, não sendo possível separar grupos

Os conjuntos de calibração e validação das amostras para o desenvolvimento dos modelos de regressão foram separados levando em consideração a retirada das amostras de todos os quadrantes e sem retirar amostras dos extremos dos valores de concentração (FERREIRA *et al.*, 1999). O conjunto de validação externa foi composto de 7 amostras e o conjunto de calibração de 35 amostras.

2.3.3.2. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os modelos de calibração foram desenvolvidos com base na metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), para previsão dos teores de Rutina, Ácido Caféico, Ácido 5-CQA e do Conteúdo fenólico total (obtidos pela soma dos teores dos compostos determinados individualmente). Nos espectros do conjunto de calibração foram aplicados diferentes pré-processamento matemáticos com a finalidade de facilitar a interpretação dos espectros, por meio da eliminação de interferentes, como a presença de ruídos, melhorando a qualidade de previsão dos modelos de regressão. O algoritmo empregado foi o NIPALS (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*), por ser mais robusto.

Vários modelos foram construídos na etapa de calibração com a finalidade de obter o menor erro de previsão para os teores dos compostos fenólicos analisados. A análise dos modelos foi feita através da análise do RMSECV (Raiz quadrada da soma dos erros de validação cruzada), em função do menor número de Variáveis Latentes (VLs) obtidas pelo método de validação interna (*leave one out*). Além disso, avaliaram-se os coeficientes de determinação (R^2) e o Erro após a etapa de validação.

Durante a etapa de calibração os pré-processamentos aplicados nas matrizes de dados foram MSC, SNV, derivação, alisamento, dados centrados na

média com a finalidade de minimizar os efeitos causados por variações aleatórias ou sistemáticas indesejáveis.

2.3.3.2.1. Modelos de calibração multivariada para previsão do teor de Rutina em erva-mate

Os melhores modelos de calibração para a previsão da concentração de Rutina nas amostras de erva-mate estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA RUTINA

| Modelos | Pré-processamento | VLs | R ² | RMSECV | RMSEP (%) |
|----------|--|----------|----------------|-------------|--------------|
| 1 | Alisamento + 2° Derivada + MSC | 3 | 0,82 | 0,41 | 16,7 |
| 2 | Alisamento + 2° Derivada + MSC | 4 | 0,89 | 0,40 | 15,9 |
| 3 | Alisamento + 1° Derivada + SNV | 5 | 0,82 | 0,39 | 12,02 |
| 4 | Alisamento + 2° Derivada + SNV | 4 | 0,89 | 0,40 | 16,2 |
| 5 | Alisamento + 2° Derivada + SNV | 5 | 0,91 | 0,39 | 15,2 |
| 6 | Alisamento + 1° Derivada + SNV | 6 | 0,91 | 0,39 | 16,5 |
| 7 | Alisamento + 2° Derivada + MSC | 5 | 0,83 | 0,39 | 12,13 |
| 8 | Alisamento + 1° Derivada + MSC | 6 | 0,87 | 0,39 | 13,3 |
| 9 | Alisamento + 2° Derivada + SNV + Centrado na média | 4 | 0,85 | 0,39 | 13,4 |
| 10 | Alisamento + 1° Derivada + SNV + Centrado na média | 5 | 0,88 | 0,40 | 13,1 |

VLs = Variáveis latentes

RMSECV = Raiz quadrada do Erro Médio da Validação Cruzada

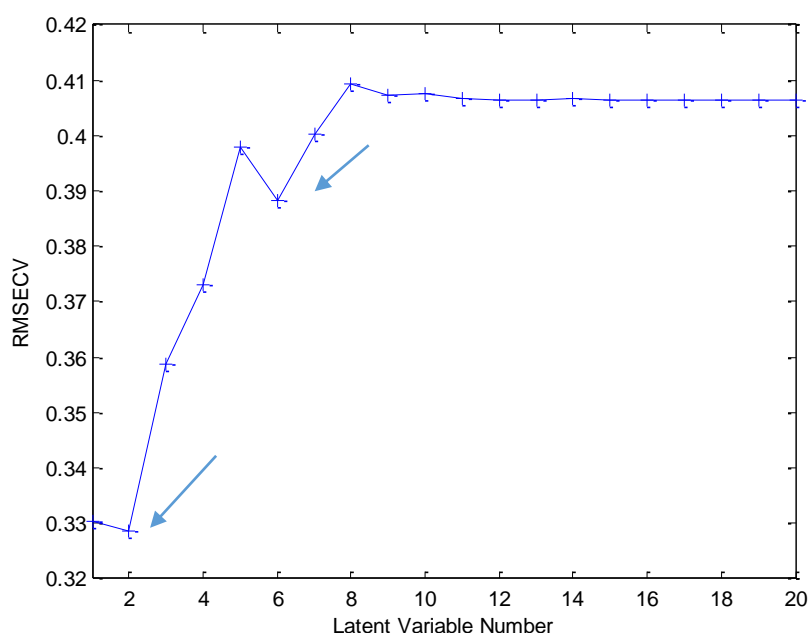
RMSEP = Raiz Quadrada do Erro Médio de Previsão

R² = Coeficiente de determinação de calibração

Ao avaliar os modelos de calibração multivariada para prever os teores de Rutina, verificou-se que os modelos 3 e 7 foram os que apresentaram os menores erros de validação externa. Avaliando o gráfico apresentado na Figura 15, é possível verificar que o menor valor de RMSECV foi com 2 variáveis latentes (VLs), sendo então desenvolvidos modelos com 2, 3, 4, 5 e 6 VLs. A partir da sexta variável latente a minimização do valor de RMSECV foi muito

pequena, não havendo a necessidade do desenvolvimento de modelos com 7 VLs ou mais. Analisando os modelos da Tabela 6, em relação a todos os parâmetros expostos, o modelo 3 foi considerado como melhor modelo para prever o teor de Rutina. Além disso 2 variáveis latentes são responsáveis por explicar somente 84,14% da variabilidade espectral e 7,88% da variabilidade da concentração de Rutina, já com 5 variáveis latentes são explicados 91,67% da variabilidade espectral e 55,23% da variabilidade da concentração de Rutina. Modelos com um grande número de variáveis latente pode superestimar a capacidade de previsão dos mesmos, devido à agregação de ruídos (MADALOZZO, 2010).

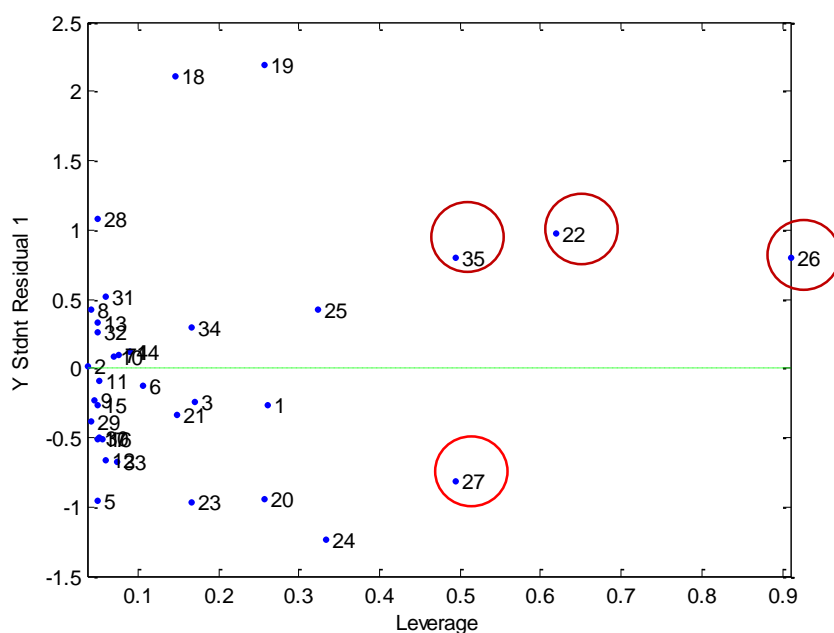
FIGURA 15 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA RUTINA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE



A Figura 16 apresenta o gráfico dos parâmetros de *Leverage* e Resíduos de *Student*, utilizados para verificar se nos modelos de calibração havia a presença de amostras anômalas (*outliers*). O limite de *Leverage* para o modelo 3 foi de 0,35 e Resíduos de *Student* de $\pm 2,5$ (95% de confiança). Ao analisar a Figura 16 foi verificado que as amostras 22, 26, 27 e 35 estavam acima do limite de *Leverage*. Sendo assim, estas amostras foram retiradas do conjunto de calibração, com a finalidade de testar o modelo, porém não foi observada

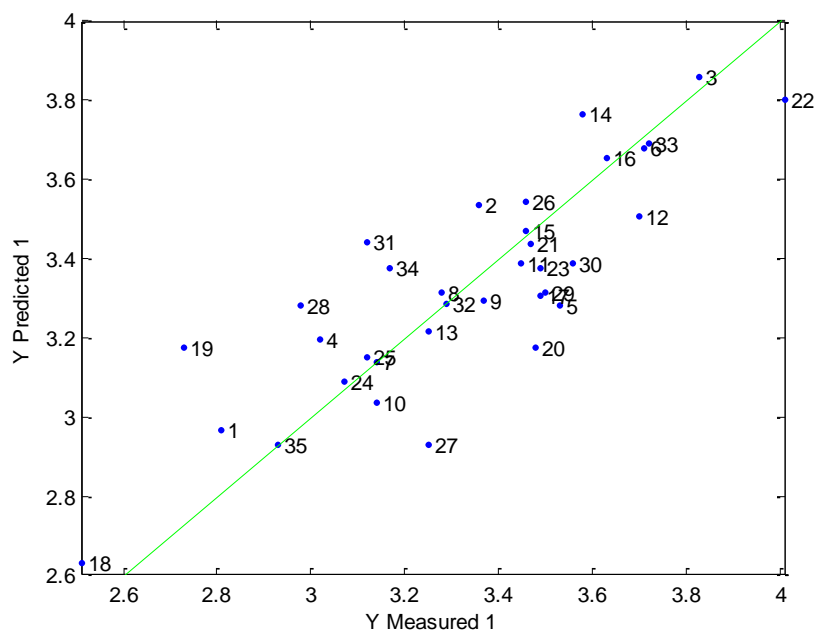
nenhuma diferença significativa nas características do modelo, sendo assim as amostras 22, 26, 27 e 35 não foram consideradas anômalas. Nenhuma amostra ficou fora do limite de Resíduos de *Student*.

FIGURA 16 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ROTINA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE



A Figura 17 apresenta o gráfico do valor medido versus o valor previsto para o Modelo 3, o qual apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,820 durante a etapa de validação cruzada. O valor medido é o teor do composto de interesse determinado pelo método de referência, neste caso o HPLC, e o valor previsto é determinado pelo modelo de calibração.

FIGURA 17 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA RUTINA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE.



Os valores previstos para o teor de Rutina nas sete amostras do conjunto de validação externa estão representados na Tabela 7, de acordo com o melhores modelos obtido na região do NIR (modelo 3).

TABELA 7 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE RUTINA PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE

| Amostra | Valor Referência (mg g ⁻¹) | Valor Previsto pelo modelo 3 (mg g ⁻¹) | Erro (%) |
|---------------------------|---|---|--------------|
| 1 | 2,96 | 2,97 | 0,30 |
| 2 | 2,95 | 3,38 | 12,80 |
| 3 | 3,70 | 3,04 | 21,50 |
| 4 | 2,90 | 3,68 | 21,10 |
| 5 | 3,92 | 3,51 | 11,40 |
| 6 | 3,61 | 3,45 | 4,40 |
| 7 | 3,56 | 3,16 | 12,50 |
| Erro médio (%) | | | 12,02 |

A capacidade de previsão de rutina foi investigada por Mao e colaboradores (2014), onde foi utilizada a Espectroscopia de Infravermelho próximo de reflectância difusa (NIRDRS) para avaliar a previsão rápida de três compostos fenólicos (ácido clorogênico, escopoletina e rutina) em amostras de tabaco curado. Em relação aos resultados para a Rutina, os autores encontram valores de RMSECV de 0,927, um R^2 de 0,924, onde o modelo foi desenvolvido com 19 variáveis latentes. O erro de validação externa foi de 5,44%.

O modelo desenvolvido e otimizado (modelo 3) para a previsão da rutina nas amostras de erva-mate apresentou resultados consideráveis favoráveis em comparação com os trabalhos semelhantes encontrados na literatura, sendo uma boa alternativa para quantificação rápida deste flavonoide.

2.3.3.2.2. Modelos de calibração multivariada para previsão do teor de Ácido Caféico em erva-mate

Os teores de ácido caféico determinados através do HPLC, no total de 42 amostras, foram correlacionados com os espectros NIR através do método PLS e vários modelos de calibração foram obtidos, os melhores resultados estão apresentados na Tabela 8.

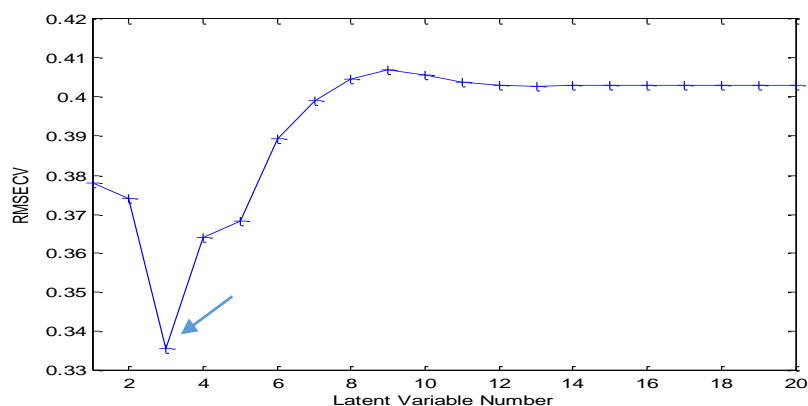
Durante a etapa de calibração foram testados diferentes pré-processamentos, entre os quais os que apresentaram melhores resultados foram a combinação de Alisamento, primeira derivada e MSC. Avaliando o gráfico mostrado na Figura 18, o menor valor de RMSECV obtido foi com duas variáveis latentes, porém os valores explicados dos dados são muito pequenos, sendo assim foram avaliados os modelos com 3, 4, 5, 6 e 7 variáveis latentes. O modelo 12 com 5 VLs apresentou melhor capacidade para predizer o teor de ácido caféico nas amostras de erva-mate.

TABELA 8 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO

| Modelos | Pré-processamento | VL | R ² | RMSECV | RMSEP (%) |
|-----------|--|----------|----------------|-------------|--------------|
| 11 | Alisamento + 1º Derivada + MSC | 4 | 0,70 | 0,36 | 30,2 |
| 12 | Alisamento + 1º Derivada + MSC | 5 | 0,78 | 0,36 | 18,31 |
| 13 | Alisamento + 2º Derivada + MSC | 6 | 0,81 | 0,38 | 21,1 |
| 14 | Alisamento + 2º Derivada + MSC | 7 | 0,83 | 0,37 | 28,1 |
| 15 | Alisamento + 2º Derivada + SNV + Centrado na média | 3 | 0,79 | 0,38 | 29,2 |
| 16 | Alisamento + 2º Derivada + SNV + Centrado na média | 4 | 0,83 | 0,38 | 32,5 |
| 17 | Alisamento + 2º Derivada + SNV + Centrado na média | 5 | 0,85 | 0,39 | 29,0 |
| 18 | Alisamento + 1º Derivada + SNV + Centrado na média | 3 | 0,70 | 0,36 | 54,4 |
| 19 | Alisamento + 2º Derivada + SNV + Centrado na média | 4 | 0,78 | 0,37 | 29,5 |
| 20 | Alisamento + 2º Derivada + SNV + Centrado na média | 5 | 0,83 | 0,39 | 39,7 |

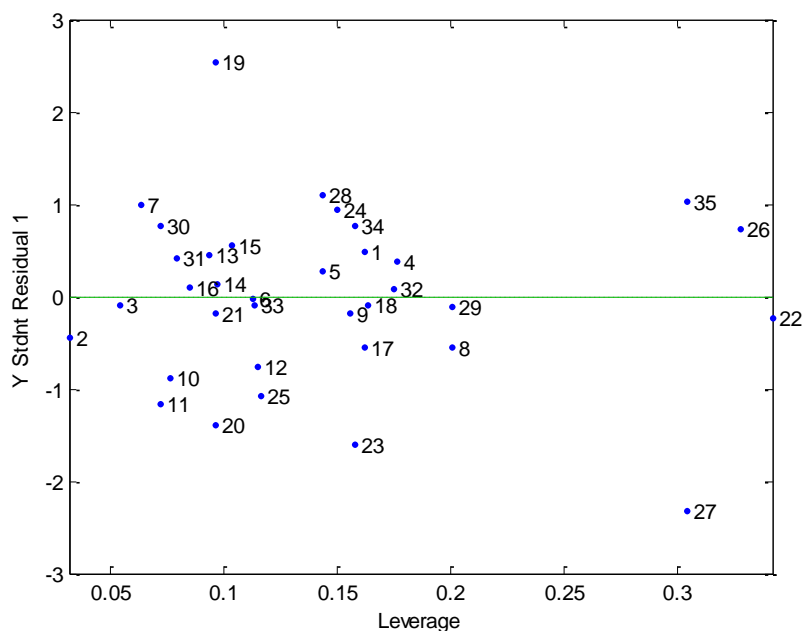
As cinco variáveis latentes do modelo de calibração foram responsáveis por explicar 99,76% da variabilidade espectral e 31,59% da variabilidade da concentração de ácido caféico. O modelo 12 apresentou o menor percentual de erro na etapa de validação externa (18,31%) e um valor de R^2 de 0,78.

FIGURA 18 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE.



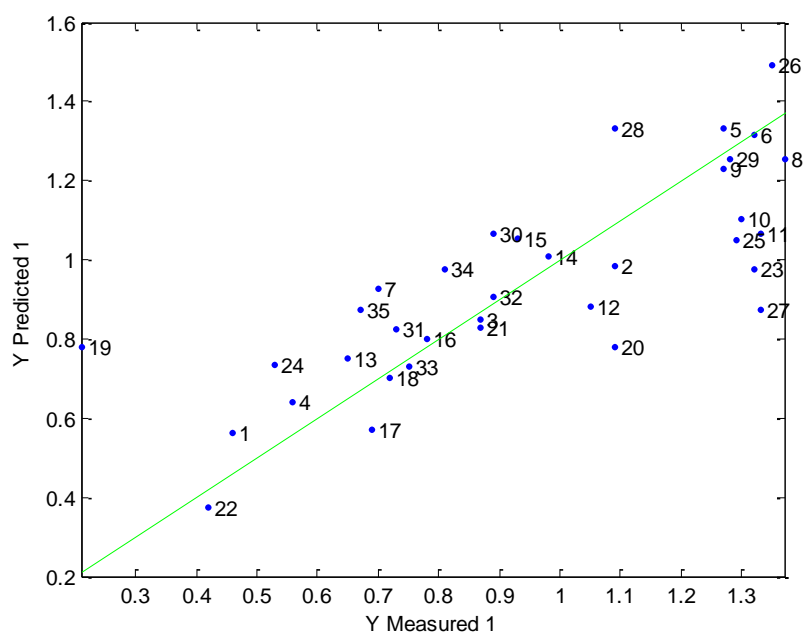
A identificação das amostras anômalas (*outliers*), do modelo 12, foram avaliadas através do gráfico apresentado na Figura 19.

FIGURA 19 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE.



O limite de *Leverage* para o modelo 12 foi de 0,35, sendo assim nenhuma amostra encontra-se fora deste limite. As amostra 19 e 27 estavam fora do limite de Resíduos de *Student*. Avaliando estas amostras em relação aos teores obtidos pelo método de referência, optou-se por deixar as duas amostras no modelo de calibração. Na Figura 20 está apresentado o gráfico do valor medido *versus* o valor previsto para o Modelo 12.

FIGURA 20 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO CAFÉICO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE.



O modelo de calibração para a determinação do conteúdo de ácido caféico em amostras de erva-mate demonstrou dificuldade de predição. O alto valor encontrado (18,3%) para o erro médio relativo indica a complexidade do modelo em determinar este parâmetro. Os teores de ácido caféico determinados por HPLC apresentam uma concentração relativamente baixa (0,21 a 1,37 mg g⁻¹) o que dificulta o desenvolvimento de modelos de calibração, visto que uma das desvantagens apresentadas pelo método NIR é sua baixa sensibilidade a pequenas concentrações (BURNS; CIURCZAK, 2001). Segundo Alcalá *et al.*, (2008), quando a concentração do analito de interesse é baixa (inferior a 1%, v/v), não é possível o desenvolvimento de modelos de calibração. A técnica NIR possui sensibilidade limitada a essas concentrações.

Na Tabela 9 estão apresentados os valores previstos para o teor de ácido caféico nas sete amostras do conjunto de validação externa de acordo com os melhores modelos obtidos nas regiões do NIR (modelo 12).

TABELA 9 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE ÁCIDO CAFÉICO PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE

| Amostra | Valor Referência (mg g ⁻¹) | Valor Previsto pelo modelo 12 (mg g ⁻¹) | Erro (%) |
|---------------------------|---|--|--------------|
| 1 | 0,58 | 0,56 | 2,54 |
| 2 | 1,36 | 0,98 | 37,47 |
| 3 | 0,89 | 0,94 | 4,67 |
| 4 | 0,67 | 0,73 | 8,64 |
| 5 | 1,19 | 0,72 | 65,52 |
| 6 | 1,26 | 1,32 | 4,22 |
| 7 | 0,82 | 0,78 | 5,11 |
| Erro médio (%) | | | 18,31 |

O erro de validação externa de 18,31% é considerado alto de acordo com trabalhos encontrados na Literatura. Avaliando os erros para cada amostra do conjunto de validação é possível observar que a amostra 1 apresentou um erro relativamente baixo (2,54%), o mesmo ocorre com as amostras 3 e 6. Em contrapartida a amostra 5 apresentou um erro de 65,52%, um erro muito elevado, o que não garante a confiabilidade da previsão do modelo.

2.3.3.2.3. Modelos de calibração multivariada para previsão do teor Ácido 5-Cafeolquínico (5-CQA) em erva-mate

Durante a fase de calibração, o conjunto composto de 35 espectros adquiridos na região do infravermelho próximo de amostras de erva-mate foi correlacionado com o respectivo teor de ácido 5-CQA. Vários modelos de calibração PLS foram construídos a fim de avaliar os tipos de pré-processamentos de dados que reproduziriam os melhores resultados. Os melhores modelos multivariados desenvolvidos estão apresentados na Tabela 10. A seleção dos modelos foi feita através da avaliação dos valores dos erros de calibração, validação cruzada e dos coeficientes de regressão dos conjuntos de calibração.

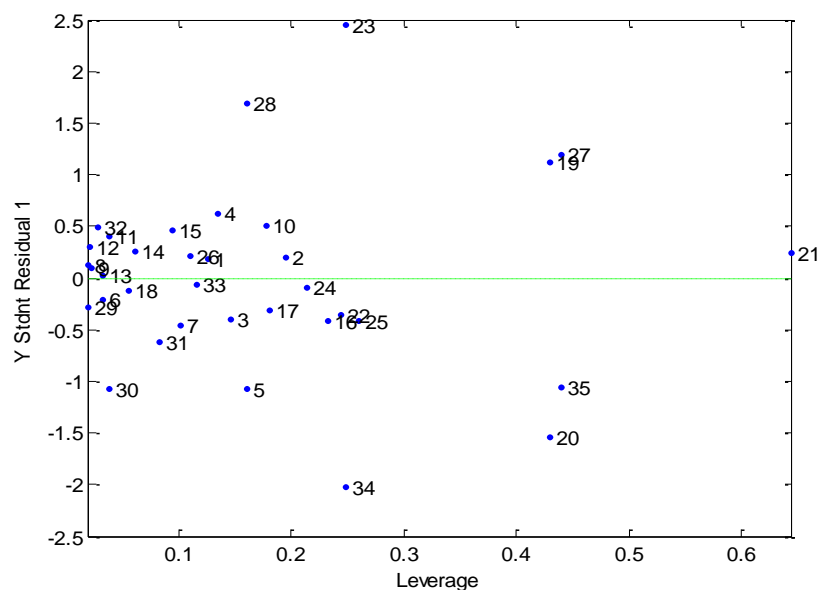
TABELA 10 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO 5 -CQA

| Modelos | Pré-processamento | VL | R ² | RMSECV | RMSEP (%) |
|-----------|---|----------|----------------|-------------|-------------|
| 21 | Alisamento + 1ª Derivada + MSC | 4 | 0,76 | 0,79 | 11,46 |
| 22 | Alisamento + 1ª Derivada + MSC | 5 | 0,83 | 0,88 | 11,33 |
| 23 | Alisamento + 1ª Derivada + MSC | 6 | 0,85 | 0,88 | 10,97 |
| 24 | Alisamento + 1ª Derivada + MSC | 7 | 0,88 | 0,92 | 11,61 |
| 25 | Alisamento + 1ª Derivada + MSC | 8 | 0,89 | 0,93 | 12,20 |
| 26 | Alisamento + 2ª Derivada + SNV + Centrado na média | 5 | 0,88 | 0,87 | 5,65 |
| 27 | Alisamento + 2ª Derivada + SNV + Centrado na média | 6 | 0,89 | 0,86 | 5,38 |
| 28 | Alisamento + 1ª Derivada + SNV + Centrado na média | 7 | 0,90 | 0,88 | 5,58 |
| 29 | Alisamento + 1ª Derivada + SNV + Centrado na média | 5 | 0,85 | 0,87 | 5,87 |
| 30 | Alisamento + 1ª Derivada + SNV + Centrado na média | 6 | 0,87 | 0,89 | 5,97 |

Ao avaliar a capacidade de previsão do teor de ácido 5-CQA pelos modelos desenvolvidos, observou-se que o modelo que apresentou menor erro de previsão, bem como menor valor de RMSECV foi o modelo 27.

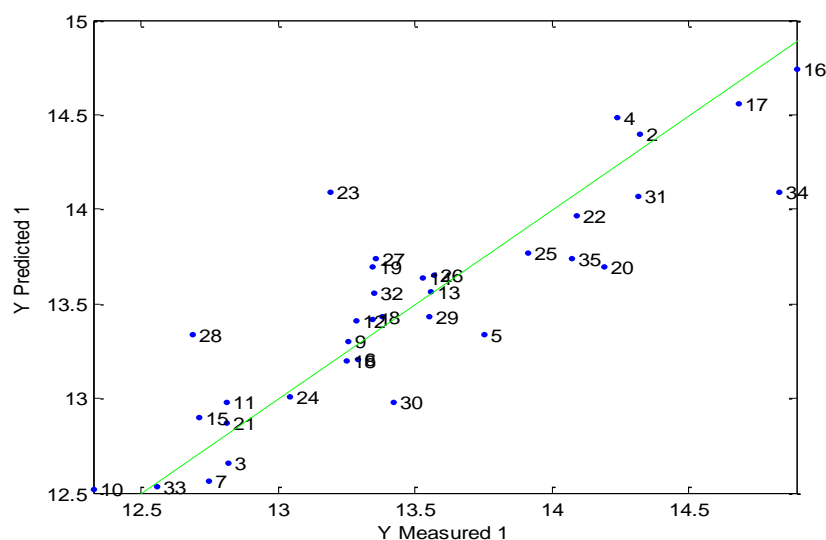
Analisando a Figura 21, onde está apresentado o gráfico dos parâmetros de *Leverage* e Resíduos de *Student*, verificou-se que a amostra 21 estava acima do limite de *Leverage*. Com a finalidade de testar o modelo, a amostra 21 foi retirada do modelo, porém não foi verificado nenhuma mudança na capacidade de previsão do modelo 27, sendo assim a amostra 21 foi mantida no modelo e não foi considerada como amostra *outlier*.

FIGURA 21 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO 5-CQA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE



A Figura 22 apresenta o gráfico de valor previsto *versus* valor medido, obtidos pelo modelo de calibração 27 para ácido 5-CQA no infravermelho próximo (NIR) para erva-mate, na etapa de validação cruzada.

FIGURA 22 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA ÁCIDO 5-CQA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE.



A Tabela 11 apresenta os valores dos erros para determinação do teor de ácido 5-CQA em erva-mate na etapa de validação externa, onde amostras que

não participaram da etapa de calibração foram testadas. O Valor médio do erro de previsão foi de 5,38%, mostrando uma boa capacidade de previsão do modelo.

TABELA 11 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE ÁCIDO 5-CQA PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE

| Amostra | Valor Referência (mg g ⁻¹) | Valor Previsto pelo modelo 27 (mg g ⁻¹) | Erro (%) |
|---------------------------|---|--|-------------|
| 1 | 13,25 | 13,25 | 0,04 |
| 2 | 13,61 | 14,08 | 3,31 |
| 3 | 13,30 | 13,44 | 1,09 |
| 4 | 14,03 | 12,47 | 12,47 |
| 5 | 13,95 | 13,67 | 2,01 |
| 6 | 12,90 | 14,77 | 12,65 |
| 7 | 14,57 | 13,75 | 6,02 |
| Erro médio (%) | | | 5,38 |

Os valores de erro de previsão do teor de 5-CQA nas amostras de erva-mate foram os melhores encontrados na previsão dos compostos fenólicos individuais, provavelmente pelo teor mais elevado deste composto presente nas amostras em relação a Rutina e ao ácido caféico.

Comparando os modelos multivariados desenvolvidos, os modelos para previsão dos teores de ácido 5-CQA, apresentaram os melhores resultados individuais, onde erro médio durante a etapa de validação externa foi de 5,38%, entre as amostra do conjunto de validação a amostra 6 apresentou o maior erro em relação as demais (12,65%). Os modelos desenvolvidos para previsão de rutina e ácido caféico apresentaram erros de 12,02% e 18,31%, respectivamente, apesar de serem valores mais elevados dos que encontrados para o ácido 5 -CQA, estes modelos poderiam ser utilizados no processamento agroindustrial da erva-mate quando o objetivo fosse avaliar a presença destes compostos.

2.3.3.2.4. Modelos de calibração multivariada para previsão do teor de Conteúdo fenólico total em erva-mate

O teor de conteúdo fenólico total foi determinado neste trabalho como sendo a soma dos teores individuais de rutina, ácido caféico e ácido 5-CQA, determinados por HPLC. Para obtenção do melhor modelo de calibração para compostos fenólicos totais, os espectros NIR foram correlacionados com os teores obtidos por HPLC, onde diferentes pré-processamentos foram testados. Os melhores modelos obtidos estão apresentados na Tabela 12.

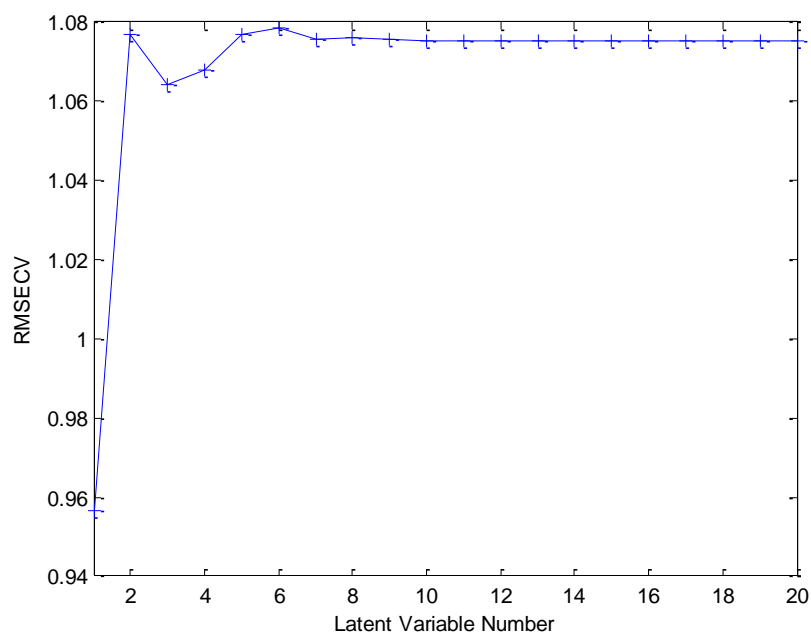
TABELA 12 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

| Modelos | Pré-processamento | VL | R ² | RMSECV | RMSEP (%) |
|-----------|--|----------|----------------|--------------|-------------|
| 31 | Alisamento + 1° Derivada + MSC | 5 | 0,76 | 1,072 | 9,53 |
| 32 | Alisamento + 1° Derivada + MSC | 6 | 0,82 | 1,093 | 8,97 |
| 33 | Alisamento + 2° Derivada + MSC + SNV | 4 | 0,72 | 0,971 | 8,10 |
| 34 | Alisamento + 2° Derivada + MSC + SNV | 5 | 0,76 | 1,07 | 8,52 |
| 35 | Alisamento + 2° Derivada + MSC + SNV | 6 | 0,82 | 1,09 | 7,95 |
| 36 | 2° Derivada + SNV | 4 | 0,74 | 1,06 | 4,29 |
| 37 | 2° Derivada + SNV | 6 | 0,84 | 1,06 | 5,20 |
| 38 | 2° Derivada + SNV + Centrado na média | 4 | 0,83 | 1,032 | 4,13 |
| 39 | 2° Derivada + SNV + Centrado na média | 5 | 0,85 | 1,059 | 4,21 |
| 40 | 2° Derivada + SNV + Centrado na média | 6 | 0,86 | 1,057 | 4,04 |

Analisando os modelos apresentados na Tabela 12, verifica-se que o modelo 40 apresentou o menor valor de erro de previsão na etapa de validação externa. O modelo 40 apresentou um valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,863 e RMSCV de 1,057. Analisando o gráfico apresentado na Figura 23, o menor valor de RMSECV ocorre com 3 e 4 variáveis latentes, porém os modelos com 3, 4 e 5 VLs apresentaram menor capacidade de previsão em relação ao modelo com 6 VLs (modelo 40). Analisando, ainda a Figura 23 é possível verificar que a partir da quinta variável latente o valor de RMSECV não varia

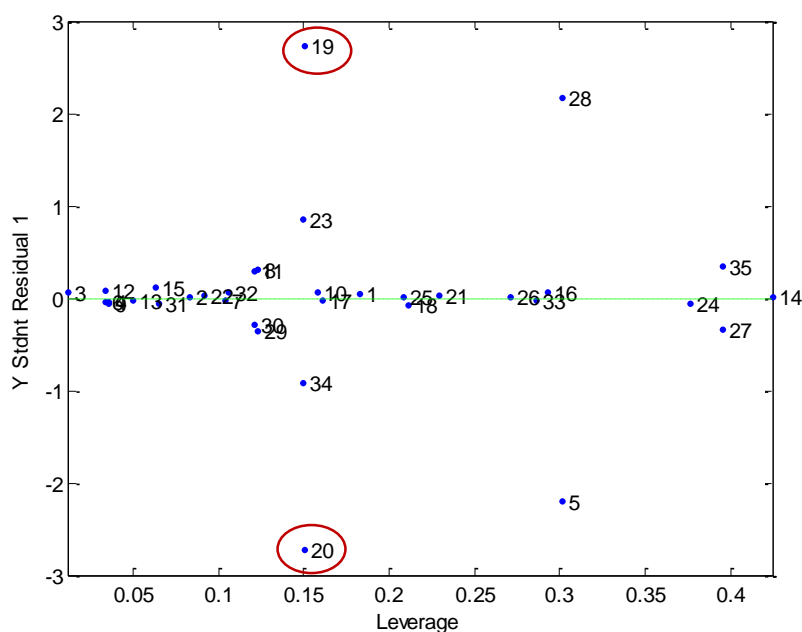
consideravelmente. Sendo assim o modelo 40 foi escolhido como sendo o melhor modelo para prever o teor de Conteúdo fenólico total em erva-mate.

FIGURA 23 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 35 AMOSTRAS.



Para otimização dos modelo de calibração foi analisado a presença ou não de amostras *outlier* ou anômalas, através do gráfico *leverage* x resíduo de *student*, mostrado na Figura 24. Analisando a Figura 24 foi possível observar que as amostras 19 e 20 estavam acima do limite de resíduos de Student ($\pm 2,5$).

FIGURA 24 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 35 AMOSTRAS.



As amostras 19 e 20 foram retiradas do conjunto de calibração para verificar se estas influenciavam de forma negativa ou não no desenvolvimento dos modelos. Os modelos desenvolvidos sem as amostras 19 e 20 apresentaram melhor capacidade de previsão dos teores de compostos fenólicos. Na Tabela 13 estão apresentados os modelos de calibração com os 33 espectros.

TABELA 13 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL SEM AMOSTRA 19 E 20

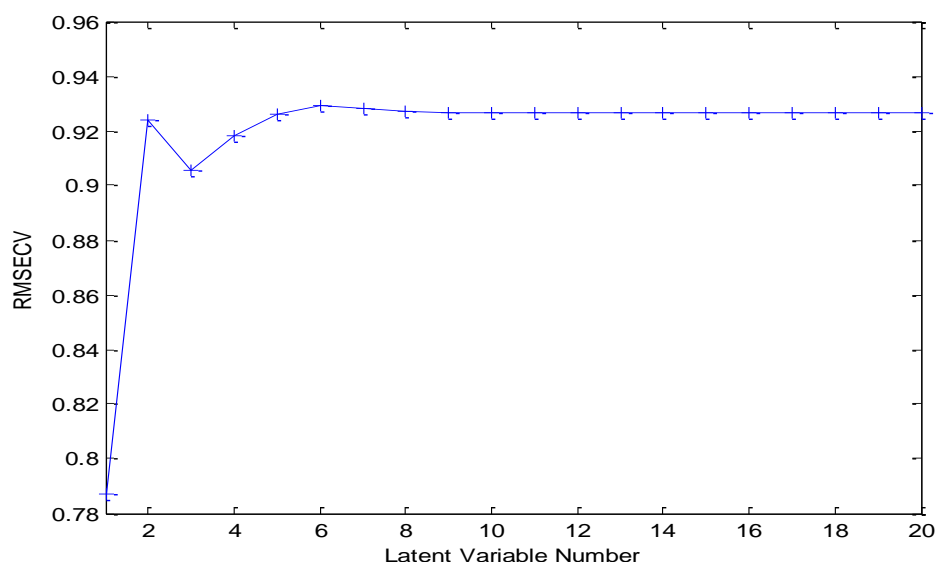
| Modelos | Pré-processamento | VL | R2 | RMSEC V | Erro (%) |
|-----------|--|----------|-------------|-------------|-------------|
| 41 | 2° Derivada + MSC + Centrado na média | 3 | 0,90 | 0,90 | 4,50 |
| 42 | 2° Derivada + MSC + Centrado na média | 4 | 0,93 | 0,92 | 3,44 |
| 43 | 2° Derivada + MSC + Centrado na média | 5 | 0,94 | 0,92 | 4,05 |
| 44 | 2° Derivada + MSC + Centrado na média | 6 | 0,94 | 0,93 | 4,20 |

A variação dos valores de RMSECV, em função do número de variáveis latentes, na região do NIR pode ser visualizada na Figura 25. O menor valor de RMSECV foi obtido com 3 variáveis latentes. Os modelos foram desenvolvidos

com 3,4,5 e 6 variáveis latentes. O menor valor do erro de previsão foi obtido com 4 variáveis latentes (modelo 42), bem como o melhor valor de coeficiente de determinação ($R^2 = 0,93$). Após a retirada das amostras 19 e 20 do conjunto de calibração, houve uma melhora significativa na capacidade de previsão dos modelos multivariados, sendo assim tais amostras foram consideradas *outliers*, sendo mantidas fora do conjunto de calibração.

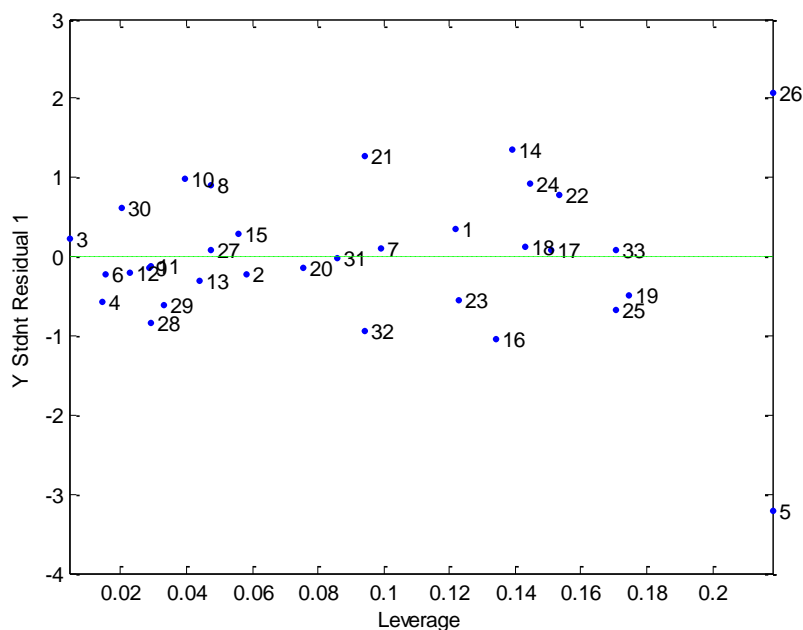
As quatro variáveis latentes do modelo de calibração 42 são responsáveis por explicar 80,64% da variabilidade espectral e 87,10% da variabilidade da concentração de Conteúdo fenólico total.

FIGURA 25 - GRÁFICOS DE RMSECV X NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 33 AMOSTRAS.



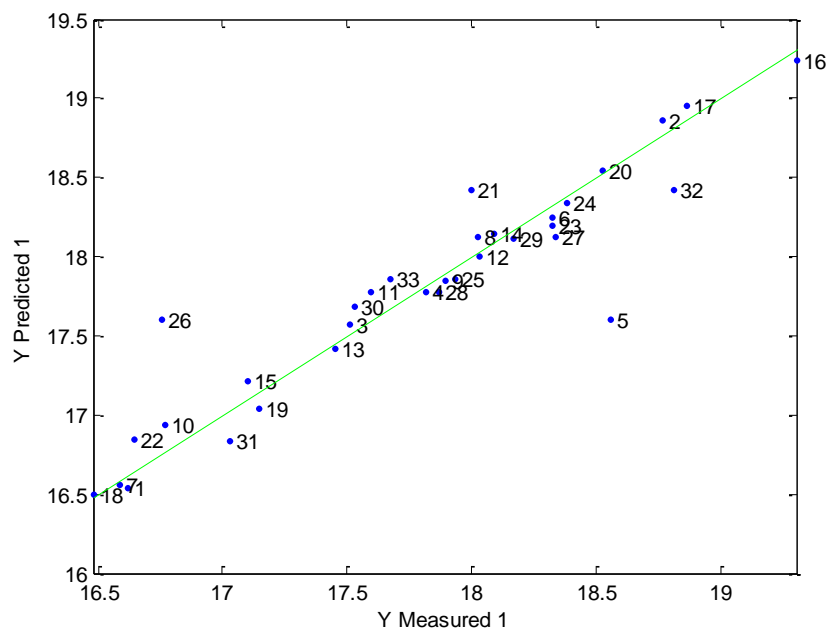
Avaliando o gráfico apresentado na Figura 26 pode-se observar que nenhuma amostra está acima do valor limite de *Leverage* (0,36), porém a amostra 5 está fora do limite de resíduos de student ($\pm 2,5$ em um nível de confiança de 95%). A amostra 5 foi retirada do conjunto de calibração, porém não houve mudança na capacidade de previsão do modelo, sendo assim a amostra 5 foi mantida no conjunto de calibração.

FIGURA 26 - GRÁFICOS DE LEVERAGE X RESÍDUO DE STUDENT OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE COM 33 AMOSTRAS.



A correlação do modelo desenvolvido para o conjunto de calibração para a previsão do teor de Conteúdo fenólico total foi verificado por meio do gráfico dos valores medidos ou determinados por HPLC *versus* valores previstos pelo modelo 40, como mostra a Figura 27. O modelo desenvolvido apresentou correlação de calibração de 0,93.

FIGURA 27 - GRÁFICO DE VALOR PREVISTO X VALOR MEDIDO OBTIDOS PELOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO (33 AMOSTRAS) PARA CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) PARA ERVA-MATE



A Tabela 14 apresenta os resultados previstos pelo modelo para o conjunto de dados de validação externa e o erro médio percentual de previsão para o conteúdo fenólico total em amostras de erva-mate.

TABELA 14 - RESULTADOS DA PREVISÃO DO TEOR DE CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL PARA AS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA, OBTIDOS PELOS MODELOS DESENVOLVIDOS PARA O INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA ERVA-MATE

| Amostra | Valor Referência (mg g ⁻¹) | Valor Previsto pelo modelo 42 (mg g ⁻¹) | Erro (%) |
|---------------------------|---|--|-------------|
| 1 | 16,78 | 16,53 | 0,50 |
| 2 | 17,92 | 17,93 | 0,06 |
| 3 | 17,60 | 17,66 | 0,38 |
| 4 | 17,60 | 16,83 | 1,86 |
| 5 | 19,05 | 17,88 | 6,75 |
| 6 | 17,78 | 19,21 | 7,45 |
| 7 | 17,96 | 18,29 | 7,09 |
| Erro médio (%) | | | 3,44 |

Chen *et al.* (2008) desenvolveram modelos multivariados para determinação de compostos fenólicos em amostras de chá verde, utilizando a correlação entre os espectros NIR e fenóis totais. De acordo com os autores, os valores de erros obtidos na etapa de validação externa foram de 0,733 e R^2 de 0,958.

Bellincontro *et al.* (2012) analisaram compostos fenólicos totais em óleo de oliva, somando os compostos específicos determinados por HPLC e obtiveram um valor de R^2 de 0,87 e RMSEP de 6,33 mg g⁻¹, com 9 variáveis latentes.

Bala e Singh (2013) avaliaram fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu convencional em sementes de mostarda, e obtiveram valor de R^2 de 0,92 e RMSEP de 0,11 com 6 VLS.

Frizon *et al.* (2015) desenvolveram modelos de calibração multivariada para determinação de compostos fenólicos em erva-mate, pelo método de Folin-Ciocalteu, e encontraram um valor médio de erro de validação externa de 12% e R^2 de 0,83 com 6 VL.

O modelo de calibração multivariada desenvolvido e validado, através do conjunto de validação externa (modelo 42), o qual apresentou valor de R^2 de 0,933, RMSECV de 0,918 e erro de validação externa médio de 3,44 % é uma opção eficaz para determinação de Conteúdo fenólico total em erva-mate. A combinação de espectroscopia NIR e calibração multivariada pode ser uma alternativa para substituição da análise por HPLC, podendo ser aplicada *online* para controle os compostos fenólicos nas etapas de processamento de erva-mate.

2.4 CONCLUSÃO

Os teores de Rutina, ácido caféico e ácido 5-CQA foram determinados em amostras de erva-mate, por meio da extração de componentes da matriz e posterior quantificação por HPLC. Os teores encontrados variaram de 2,50 e 4,01 mg g⁻¹ para a rutina, para o ácido 5-CQA os teores variaram entre 12,324 e 14,892 mg g⁻¹. Os teores encontrados para o ácido caféico variaram entre 0,21 e 1,37 mg g⁻¹. Em relação aos teores de Conteúdo fenólico total (considerados

como a soma dos teores de rutina, ácido caféico e ácido 5-CQA), foram encontrados variações entre 16,282 e 19,303 mg g⁻¹.

Os espectros das amostras de erva-mate foram obtidos na região do infravermelho próximo por reflectância difusa. A análise das componentes principais (PCA) não identificou diferença entre as amostras, as quais eram de diferentes municípios do estado do Paraná e diferentes safras (2013 e 2014), mostrando uma similaridade em relação a composição química das amostras.

O método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), possibilitou o desenvolvimento de modelos multivariados com elevados coeficientes de regressão e baixos erros de previsão. Estes modelos se mostraram eficientes para previsão dos teores de Rutina, ácido 5-CQA e Conteúdo fenólico total. Os modelos desenvolvidos para prever os teores de ácido caféico não apresentaram bons resultados, onde o menor erro de previsão encontrado foi de 18,31%, podendo ser explicado pela baixa sensibilidade do NIR quando se tem pequenas concentrações na amostra.

Os modelos para Rutina, Ácido 5-CQA e Conteúdo fenólico total apresentaram erros médios de 12,02 (com 5 variáveis latentes), 5,38 (com 6 variáveis latentes) e 3,44 (com 4 variáveis latentes), respectivamente, na etapa de validação externa.

A espectroscopia na região do infravermelho aliada à calibração multivariada permitiu a obtenção de modelos com bom desempenho para previsão dos teores dos compostos fenólicos em erva-mate, através da utilização de diferentes pré-processamentos que auxiliaram na extração das informações analíticas sem prejudicar os resultados.

A espectroscopia na região do infravermelho próximo associado a calibração multivariada mostrou-se uma forma eficiente para determinação dos teores de compostos fenólicos em amostras de erva-mate, podendo ser aplicado como controle de qualidade na agroindústria ervateira.

CAPITULO III

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NO AMIDO DE MILHO CEROSO

RESUMO

O amido nativo, extraído das plantas sem nenhuma modificação, apresenta algumas limitações para muitas aplicações em processos industriais modernos. A modificação dos amidos nativos é uma alternativa para promover o aumento do uso deste polímero, onde a incorporação de compostos fenólicos a amidos nativos é uma alternativa para melhorar suas propriedades funcionais. O objetivo deste trabalho foi analisar o amido de milho ceroso tratado com extrato aquoso de erva-mate por meio de técnicas termoanalíticas (Termogravimetria– TG, calorimetria exploratória diferencial – DSC), técnicas estruturais (microscopia eletrônica de varredura – MEV e difratometria de raios X – DRX) e avaliação das propriedades de pasta (RVA). Extrato aquoso de erva-mate foi incorporado no amido de milho ceroso. A análise de compostos fenólicos totais verificou que parte do conteúdo fenólico foi incorporado no amido nativo. Pelo TG, observou-se que a incorporação de compostos fenólicos elevou a estabilidade térmica do amido de milho ceroso. Na análise de DSC observou-se uma diminuição da entalpia de gelatinização após a incorporação dos compostos fenólicos. Pelo RVA observou-se uma diminuição na viscosidade de pico e viscosidade final em todas as amostras tratadas. Através dos difratogramas de raios X foi verificado que as amostras (A, B, C, D, E) apresentaram padrão cristalográfico do tipo A, ocorreu um aumento da cristalinidade das amostras tratadas em relação ao amido nativo. As micro-imagens (MEV) possibilitaram o estudo da estrutura e a superfície dos grânulos de amido. Por meio dos dados obtidos no FTIR foi feito uma PCA que mostrou que as amostras tratadas se diferenciam da amostra nativa, caracterizando uma mudança na estrutura do amido.

3.1 INTRODUÇÃO

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa da América do Sul, representando grande importância econômica e cultural para os países dessa região, sendo consumida na forma de chá ou chimarrão. As folhas de erva-mate apresentam capacidade antioxidante devido à presença de compostos fenólicos, entre eles rutina, ácido caféico e ácido 5-cafeolquínico (BRAVO; GOYA;

LECUMBERRI, 2007; VIEIRA *et al.*, 2008; ANESINI *et al.*, 2012). O potencial antioxidante das infusões de erva-mate foram largamente estudadas tanto *in vitro* (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007) quanto *in vivo* (BOAVENTURA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2012). Além dos compostos fenólicos, encontram-se na erva-mate as metilxantinas que são estimulantes do sistema nervoso central. Além disso estudos mostram que a erva-mate apresenta propriedades diuréticas, antiinflamatórias, efeitos cardio-protetores e efeitos anti-obesidade (GORZALCZANY *et al.*, 2001; SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005).

O amido nativo é aquele extraído das plantas sem nenhuma modificação, no entanto, existem limitações quanto às suas propriedades funcionais que o tornam inadequado para muitas aplicações em processos industriais modernos (APLEVICZ, DEMIANTE, 2007; KARIM, SUFHA, ZAIDUL, 2008). Uma alternativa que vem sendo muito utilizada nas indústrias modernas é o uso de amidos modificados com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e, assim promover o aumento da utilização desse polímero (APLEVICZ, DEMIANTE, 2007; LACERDA *et al.*, 2008).

O termo ceroso (ou no inglês, *waxy*) refere-se às variedades de amido que são compostos totalmente por amilopectina. O milho ceroso, é um cereal melhorado, sendo cultivado a mais de 100 anos no leste e sudeste asiático. A textura é um dos aspectos mais importantes oferecido pelo milho ceroso no âmbito alimentar (TESTER; KARKALAS, 2004; LERTRAT; THONGNARIN, 2008).

A incorporação de compostos fenólicos em sistemas alimentícios pode ser uma prática promissora para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Estudos mostram que os compostos fenólicos ou polifenóis podem influenciar as propriedades de gelatinização dos amidos (ZHU, 2010), podem inibir a retrogradação do amido de arroz (WU *et al.*, 2009), alterando também a viscosidade, adesividade e dureza do gel de amido de trigo (ZHU *et al.*, 2009). No entanto não existem estudos relacionados à modificação de amidos a partir de infusões, somente de extratos puros.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de infusões de erva-mate, em diferentes concentrações nas propriedades térmicas, de pasta e estruturais do amido de milho ceroso.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO AMIDO

O amido de milho ceroso foi misturado com infusões aquosas de erva-mate. Foram realizadas infusões aquosas de duas amostras diferentes de erva-mate na concentrações de 5 e 15%. A amostra 1 era do município de São Mateus do Sul, enquanto a amostra 2 era do município de Cruz machado, ambas as amostras eram da safra de 2014. Na Tabela 15 estão apresentados os dados de concentração dos compostos fenólicos das amostras 1 e 2, determinados por HPLC.

TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO 5-CQA, AC, RUTINA E CFT DE AMOSTRAS DE ERVA-MATE DETERMINADOS POR HPLC

| Amostra | 5-CQA | AC | Rutina | CFT |
|---------|--------|------|--------|--------|
| 1 | 13,614 | 1,36 | 2,95 | 17,917 |
| 2 | 13,38 | 1,37 | 3,28 | 18,028 |

5-CQA – Ácido 5 -cafeoilquinico

AC – Ácido caféico

CFT – Conteúdo Fenólico total

As amostras de erva-mate foram pesadas e misturadas com água a temperatura de 95°C. A mistura foi deixada em repouso por 20 minutos, sendo filtrada em seguida. A solução filtrada (100 mL) foi misturada com 20 g de amido de milho ceroso, sendo então deixada sob agitação por 60 minutos. A solução extrato+ amido foi filtrada e seca em estufa a 40°C por 24 horas. As amostras foram moídas e armazenadas em dessecador até o momento das análises.

As amostras foram codificadas da seguinte maneira: (A): amido nativo; (B) amido incorporado com extrato aquoso da erva-mate 1 na concentração de 5%; (C): amido incorporado com extrato aquoso da erva-mate 1 na concentração de 15%; (D): amido incorporado com extrato aquoso da erva-mate 2 na concentração de 5%; (E): amido incorporado com extrato aquoso da erva-mate 2 na concentração de 15%.

3.2.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

3.2.2.1 *Extração dos compostos fenólicos das amostras*

Para extração dos compostos fenólicos das amostras de amido modificado foi utilizada uma solução extratora composta por 80 mL de álcool, 20 mL de água destilada e 1 mL de ácido fórmico 3%. Em um tubo de centrifuga, foi adicionado 1g da amostra e 10 mL da solução extratora, a solução foi agitada e deixada no freezer por 24 horas. Após esse tempo, a solução foi centrifugada por 20 minutos, onde o sobrenadante foi coletado e colocado em uma balão volumétrico de 25 mL. Foi adicionada mais 10 mL da solução extratora, no tubo que continha a amostra, sendo esta centrifugada novamente por 20 minutos. O sobrenadante foi colocado no balão e o volume completado para 25mL com água destilada.

3.2.2.2. *Quantificação dos compostos fenólicos*

Para determinação do teor de compostos fenólicos totais foram adicionados 0,4 mL da amostra em um tubo de ensaio, 8,4 mL de água destilada, 0,5 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de Na_2CO_3 . A solução foi homogeneizada deixada em repouso por 60 minutos, sendo então realizada a leitura da solução em espectrofotômetro em 720nm. O Ácido Gálico foi utilizado como padrão.

3.2.3 TERMOGRAVIMETRIA / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidos usando o sistema de análise térmica TGA-50 (Shimadzu), em que as amostras foram aquecidas de 30 a 650°C, usando cadinhos de alumina com aproximadamente 10 mg de amostra, sob um fluxo de ar 150 mL min^{-1} e em uma razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} . O instrumento foi previamente calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Todas as porcentagens de perdas de massa foram calculadas através do software TA-60 WS. As curvas de termogravimetria derivada (DTG) foram

calculadas com o software e utilizadas para a determinação das temperaturas de pico de perda de massa.

3.2.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas DSC foram feitas no equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA). Preparou-se suspensões com 2,5 mg de amido, e com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 10 μL de água, para que a proporção fosse 1:4 (amido:água). Os cadinhos de alumínio usados foram selados para se observar o fenômeno de gelatinização. A suspensão ficou em repouso por 1 h para equilibrar a umidade.

As condições do equipamento foram: razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de ar de 50 mL min^{-1} . O equipamento utilizado foi previamente calibrado com um padrão de índio 99,99 % (Ponto de fusão = $156,4^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H_{\text{fus}} = 28,50 \text{ J g}^{-1}$).

3.2.5 PROPRIEDADES DE PASTA

As curvas de propriedade de pasta (RVA) foram obtidas por meio de um viscosímetro RVA-4 (Newport Sci., Austrália). Para a análise preparou-se uma suspensão de 2,24 g de amido em base seca, junto a 25,76 g de água destilada.

A suspensão preparada foi submetida a uma agitação rotacional de 160 rpm e aquecimento contínuo de 50 a 95°C a uma taxa de $6^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A temperatura foi mantida a 95°C durante 5 min, e então resfriada até 50°C novamente. Todo o processo teve uma duração de 23 minutos. O software utilizado para obtenção dos dados e das curvas foi o Thermocline for Windows (TCW).

3.2.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

As amostras foram analisadas no Difrátômetro de raios-X Ultima 4 (Rigaku, Japão). Cada amostra foi depositada sobre um suporte de vidro e exposta a radiação $\text{CuK}\alpha$ (comprimento de onda de $1,541 \text{ \AA}$) submetidas a 40 kV e corrente de 30 mA. A radiação dispersa foi detectada na faixa angular de

5-50 ° (2 θ), com tempo de varredura de 2 ° min⁻¹ e uma etapa de 0.02 °. O grau de cristalinidade relativa foi estimado utilizando a equação 3, descrita na literatura (Oliveira *et al.*, 2014).

$$X_c = \frac{A_p}{(A_p + A_b)} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde X_c = cristalinidade relativa; A_p = área do pico; A_b = área de base do difratograma.

3.2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada por meio de um espectrofotômetro Shimadzu FT-IR 8400 (Shimadzu, Japan). As curvas foram realizadas a uma resolução de 4 cm⁻¹, com 64 escaneamentos. Os espectros foram obtidos utilizando pastilhas contendo uma mistura homogênea de 100mg de KBr seco e 2 mg da amostra seca. Os espectros foram obtidos no comprimento de onda de 400 a 4000 cm⁻¹.

3.2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no equipamento VEGA3 (TESCAN). A escala de leitura foi de 20 µm, com 20 kV de tensão no feixe de elétrons, filamento de tungstênio e detector de elétrons retro-espelhado. O equipamento se baseia na passagem de elétrons através da amostra, previamente preparada, desse modo, inicialmente a amostra foi fixada em uma fita adesiva de carbono, preparada pelo processo de metalização com plasma de ouro e paládio. A leitura da imagem se dá a partir do detector de elétrons, o microscópio eletrônico, que registra as imagens e as transmite a um software instalado no computador acoplado ao equipamento.

3.2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram utilizados para comparar as médias amostrais com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o software Origin 8.0®, sendo realizada em triplicata.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais analisados nas amostras de amido de milho ceroso modificado com extrato aquoso de erva-mate estão apresentados na Tabela 16.

TABELA 16 - RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA COMPOSTOS FENÓLICOS NAS AMOSTRAS DE AMIDOS ANALISADAS (ppm de Ácido Gálico)

| Amostra | Teor de compostos fenólicos Totais (ppm) |
|-------------------------------------|---|
| A = (amido nativo) | Não detectado |
| B=(amido + extrato erva-mate1 - 5%) | 1120 |
| C=(amido + extrato erva-mate1-15%) | 1458 |
| D=(amido + extrato erva-mate2 - 5%) | 2087 |
| E=(amido + extrato erva-mate2-15%) | 2450 |

Analisando os resultados da Tabela 16 é possível verificar que os compostos fenólicos presentes nos extratos de erva-mate migraram para o amido, após a incorporação dos extratos ao amido de milho ceroso. Foi verificado também que os extratos que apresentavam maior concentração de erva-mate (15%) apresentaram maior migração dos compostos fenólicos.

3.3.2 TERMOGRAVIMETRIA/ TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

Os resultados TG/DTG para o amido de milho ceroso e para as amostras que foram tratadas com extrato aquoso de erva-mate estão apresentados na Tabela 17. As perdas de massa das amostras ocorreram em três etapas. A

primeira etapa da perda de massa ocorre pela vaporização de compostos voláteis, em especial as moléculas de água adsorvidas nos grânulos de amido, sendo assim, a primeira perda de massa corresponde à umidade das amostras (DI-MEDEIROS *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2014). A umidade das amostras, obtida pelo TG foi: (A) 8,99%, (B) 10,15%, (C) 8,77%, (D) 9,98% e (E) 9,72%. As primeiras perdas de massa ocorreram desde a temperatura ambiente até 150°C para o amido nativo, enquanto que para as amostras de amido incorporadas de polifenóis as temperaturas de conclusões da primeira etapa foram mais baixas, em torno de 135°C.

Após a etapa de estabilidade, ocorreu a segunda perda de massa, que corresponde à decomposição da cadeia principal do carbono. Na segunda etapa, a perda de massa foi bastante acentuada, revelando a presença de grande quantidade de compostos que apresentam propriedades térmicas semelhantes, sendo um comportamento dos homopolissacarídeos, grupo do qual o amido pertence. (DI-MEDEIROS *et al.*, 2014).

Segundo Agarwall e Dollimore (1998), quando o amido é aquecido acima de 300°C, provavelmente irá ocorrer a despolimerização de suas cadeias. O amido passará por modificações irreversíveis, como alteração na estrutura do polímero e formação de pirodextrinas. A despolimerização em temperaturas mais elevadas pode levar a formação de compostos como levoglucosana, furfural, produtos carbonáceos e compostos de baixo peso molecular.

A segunda etapa de perda de massa das amostras de amidos tratadas iniciaram-se em temperaturas mais baixas quando comparadas com o amido de milho ceroso nativo. As temperaturas de conclusão das amostras tratadas, tanto na segunda quanto na terceira etapa não apresentaram mudanças significativas em relação ao amido nativo. A porcentagem de perda de massa na segunda etapa das amostras tratadas foi mais elevada em relação ao amido nativo.

A segunda e a terceira perda de massa, ocorrem de forma consecutiva, e são devidas à decomposição e oxidação da matéria orgânica até a formação de cinzas. As cinzas encontradas para as amostras foram: (A) 3,7%, (B) 2,88%, (C) 2,22%, (D) 2,28% e (E) 2,55%. Os teores de cinzas determinados apresentaram-se elevados, onde em trabalhos semelhantes este teor ficou em torno de 0,3% (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

TABELA 17 - RESULTADOS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMIDO DE MILHO CEROSO MODIFICADO POR EXTRATOS DE ERVA-MATE (B), (C), (D) E (E).

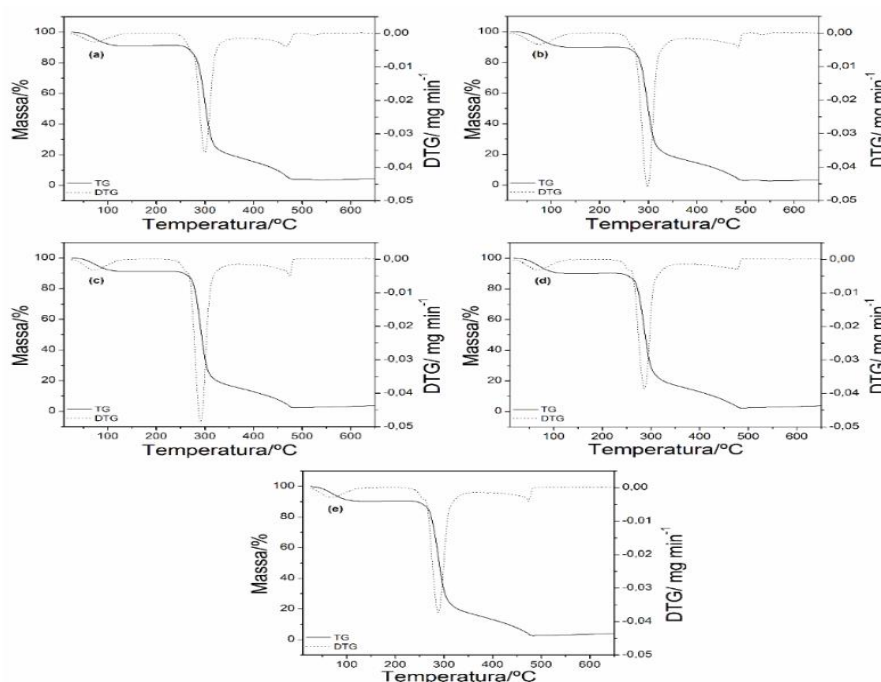
| Amostra | Resultados TG/DTG | | | |
|---------|-------------------|---------------|---------------------------|----------------------|
| | Etapa | $\Delta m/\%$ | $\Delta T/^\circ\text{C}$ | $T_p/^\circ\text{C}$ |
| (A) | 1° | 8.99 | 26-125 | 72.66 |
| | Estabilidade | - | 125-242 | - |
| | 2° | 73.81 | 242-391 | 299.56 |
| | 3° | 13.50 | 391-492 | 466.34 |
| (B) | 1° | 10.15 | 16-130 | 76.43 |
| | Estabilidade | - | 130-235 | - |
| | 2° | 74.22 | 235-383 | 297.98 |
| | 3° | 12.75 | 383-505 | 483.50 |
| (C) | 1° | 8.77 | 26-135 | 73.18 |
| | Estabilidade | - | 135-229 | - |
| | 2° | 76.96 | 229-388 | 290.89 |
| | 3° | 12.05 | 388-490 | 474.94 |
| (D) | 1° | 9.98 | 17-125 | 66.75 |
| | Estabilidade | - | 125-227 | - |
| | 2° | 74.42 | 227-373 | 286.13 |
| | 3° | 13.32 | 373-490 | 476.67 |
| (E) | 1° | 9.72 | 26-125 | 68.87 |
| | Estabilidade | - | 125-226 | - |
| | 2° | 74.36 | 226-389 | 288.12 |
| | 3° | 13.37 | 389-495 | 474.16 |

Δm , perda de massa (%); ΔT , diferença de temperatura ($^\circ\text{C}$); T_p , temperatura de pico ($^\circ\text{C}$). AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

As amostras tratadas (B, C, D e E) demonstraram semelhanças entre si, apresentando um aumento de perda de massa na segunda etapa, porém somente as amostras B e C apresentaram temperaturas maiores de conclusão nessa etapa, frente ao amido nativo. Oliveira e colaboradores (2014) avaliaram a modificação do amido de milho ceroso com concentrações diferentes de ácido clorídrico, e obtiveram resultados semelhantes, porém a temperatura de

conclusão das etapas de perdas de massa foram maiores para os amidos modificados, caracterizando um aumento da estabilidade térmica do amido. No presente trabalho houve uma diminuição da estabilidade térmica dos amidos após a incorporação dos compostos fenólicos para as amostras (D) e (E). Enquanto as amostras (B) e (C) tiveram sua estabilidade térmica aumentada.

FIGURA 28 - CURVAS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d=EEM2 A 5%) E (e=EEM2 A 15%).

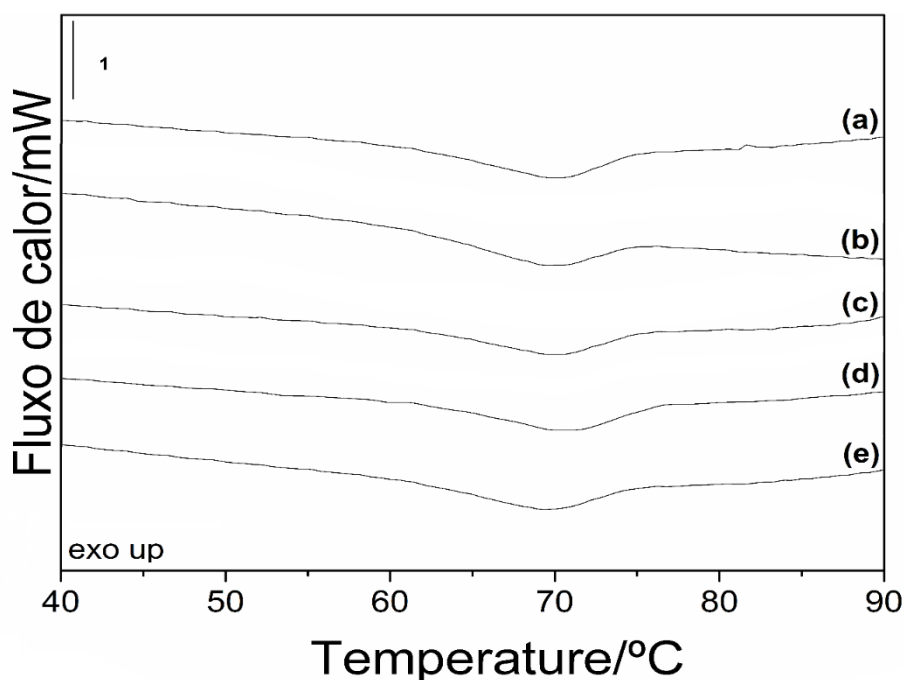


A Figura 28 ilustra as curvas TG/DTG das amostras analisadas. As curvas DTG se caracterizam por ser um recurso matemático que permite determinar com exatidão, as temperaturas correspondentes ao início e ao instante em que a velocidade de reação é máxima, ou seja a velocidade de perda de massa é máxima (IONASHIRO, 2005). Através das curvas apresentadas na Figura 28 é possível verificar que em todas as amostras a velocidade máxima de perda de massa ficou em torno de 300°C. as amostras de amido incorporadas de compostos fenólicos apresentaram temperatura de velocidade máxima de reação um pouco inferior ao da amostra de amido nativo, o que pode ter ocorrido devido a presença dos polifenóis.

3.3.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

O processo de gelatinização dos amidos e seus parâmetros específicos foi avaliada através das curvas DSC. O processo de gelatinização dos amidos é um fenômeno endotérmico e considerado uma transição fraca, o mesmo só ocorre com os amidos em suspensão aquosa e em cadinhos selados, por isso selou-se 10 μ L da suspensão de amido preparada em cadinhos de alumínio para a obtenção das curvas da Figura 29. A Figura 29 mostra que as curvas de gelatinização do amido iniciaram entre 62 a 65°C e concluíram-se de 73 a 76°C. Todas as curvas apresentaram pico endotérmico característico da curva de gelatinização.

FIGURA 29 – CURVAS DSC AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADO DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d=EEM2 A 5%) E (e=EEM2 A 15%).



Os valores dos parâmetros analisados (T_o , T_p , T_c , ΔH) estão apresentados na Tabela 18. A temperatura inicial de gelatinização dos amidos com incorporação dos extratos de erva-mate foi superior em relação ao amido nativo. Todas as amostras apresentaram valores de T_p e T_c muito próximos. A entalpia de gelatinização diminuiu nas amostra de milho ceroso tratadas com

extrato aquoso de erva-mate, sendo que a amostra (B) apresentou o menor valor de entalpia.

Oliveira *et al.* (2014) estudaram a modificação do amido de milho ceroso com HCl, e obtiveram valores menores de entalpia de gelatinização para as amostras tratadas. No mesmo trabalho foi verificado que as amostras nativas apresentaram T_o , T_p e T_c inferiores ao encontrado neste trabalho

Analisando outros trabalhos da literatura, a modificação do amido de milho ceroso leva a diminuição da entalpia de gelatinização, onde as diferenças de valores encontrados se deve ao diferente tratamento realizado para a modificação do amido (LUO *et al.*, 2006; MIAO *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2012). A redução do ΔH_{gel} pode ocorrer pela hidrólise das estruturas cristalinas e helicoidais do amido (JIANG *et al.*, 2011). A entalpia de gelatinização mostrada na Tabela 18 apresentou um valor mais baixo quando comparado com outros trabalhos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A diminuição da entalpia de gelatinização é um aspecto favorável para a indústria alimentícia em relação as necessidades energéticas do processamento do amido. A diferença da concentração de erva-mate nos extratos não resultou em grande diferença entre os dados obtidos no DSC.

TABELA 18 - RESULTADOS DSC PARA AS AMOSTRAS A, B, C, D e E.

| Amostra | DSC gelatinização | | | |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| | $T_o/^{\circ}C$ | $T_p/^{\circ}C$ | $T_c/^{\circ}C$ | $\Delta H_{gel}/J\ g^{-1}$ |
| A | 62.4±0.09 ^d | 69.7±0.01 ^b | 74.4±0.09 ^b | 3.4±0.33 ^a |
| B | 62.7±0.04 ^c | 69.3±0.01 ^c | 73.9±0.01 ^d | 2.7±0.02 ^c |
| C | 62.9±0.08 ^b | 69.7±0.06 ^b | 74.1±0.02 ^c | 2.9±0.08 ^{bc} |
| D | 64.9±0.03 ^a | 71.1±0.01 ^a | 75.0±0.02 ^a | 3.0±0.04 ^{abc} |
| E | 62.6±0.10 ^c | 69.3±0.02 ^c | 73.9±0.02 ^d | 3.2±0.08 ^{ab} |

(*) T_o “onset” temperatura inicial, T_p temperatura de pico, T_c temperatura de conclusão, ΔH_{gel} entalpia de gelatinização. Medidas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Amostra de amido de milho ceroso (A), amostras de amido de milho ceroso incorporado de extrato de erva-mate/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D=EEM2 A 5%), (E=EEM2 A 15%).

Zhu e Wang (2012) avaliaram as propriedades térmicas e reológicas do amido de arroz com diferentes teores de amilose na presença de Rutina. Os resultados encontrados por estes autores mostraram que quanto maior o teor de amilose mais elevadas são as T_o , T_p e T_c , interferindo, assim, nas propriedades de gelatinização do amido de arroz. As curvas realizadas para a rutina pura não mostraram nenhum pico térmico, ou seja, esta se mantém na forma cristalina até 130°C, aproximadamente, na presença de água. A presença de rutina levou a uma diminuição nas temperaturas de início, pico e conclusão do amido, bem como uma diminuição na entalpia de gelatinização.

Wu e colaboradores (2009) avaliaram a influência de polifenóis na retrogradação do amido de arroz. As análise de DSC mostraram que a presença de polifenóis diminuiu a gelatinização e a retrogradação do amido de forma proporcional ao aumento da concentração destes compostos.

ZHU *et al.* (2009) avaliaram a influência de extratos de diferentes plantas, com presença de compostos fitoquímicos, nas propriedades térmicas, de pasta e de gelificação do amido de trigo e verificaram que os parâmetros determinados por DSC não sofreram alterações devido à presença destes compostos.

3.3.4 PROPRIEDADES DE PASTA

A Tabela 19 apresenta os valores obtidos no RVA. Analisando estes valores observou-se uma diminuição de viscosidade de pico e viscosidade final após a incorporação dos compostos fenólicos, por meio dos extratos de erva-mate. A tendência de retrogradação aumentou após o tratamento das amostras. As amostras tratadas apresentam valores de quebra e viscosidade final menores em relação ao amido nativo. A temperatura de pasta determinada pelo RVA corresponde a temperatura de pico determinada por DSC, comparando os resultados das duas técnicas é possível observar que as temperaturas são muito semelhantes entre si, onde uma possível variação é devido a diferença da técnica.

Durante a fase inicial de aquecimento, um aumento na viscosidade é registrado no RVA quando os grânulos começam a inchar. Neste ponto,

polímeros com menor peso molecular, particularmente moléculas de amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos. Um pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também grânulos intactos e o alinhamento molecular dos polímeros solubilizados ainda não ocorreu dentro do campo de atrito do instrumento. Durante a fase de temperatura (95°C) e agitação constantes os grânulos começam a quebrar, a solubilização dos polímeros continua e o alinhamento molecular ocorre dentro do campo de atrito do instrumento, causando uma diminuição da viscosidade (THOMAS; ATWELL, 1999).

Ao ocorrer resfriamento, alguns polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar, formando um precipitado ou gel ocorrendo um aumento na opacidade da pasta. Este processo é chamado retrogradação ou *setback* (WHISTLER; BEMILLER, 1997) e ocorre aumento da viscosidade. Dependendo do tipo de amido (da fonte botânica, ou se é um amido natural ou modificado), do nível de sólidos, do pH e do regime de aquecimento, vários perfis de gelatinização e empastamento podem ser gerados (THOMAS; ATWELL, 1999).

Zhu *et al.* (2009) avaliaram as propriedades de pasta do amido de trigo após a incorporação de compostos fenólicos. Os resultados obtidos por RVA mostraram um aumento na viscosidade de pico, bem como uma diminuição do tempo de pico e viscosidade de pasta. O pH das amostras tratadas foi menor em relação ao amido nativo. A viscosidade final foi menor em todas as amostras tratadas. A interação dos compostos fenólicos com o amido levou a uma diminuição do pH das amostras, o que levou a uma reorganização das cadeias de amilose e amilopectina, sendo assim a estrutura química dos compostos fenólicos influencia as propriedades de pasta dos amidos.

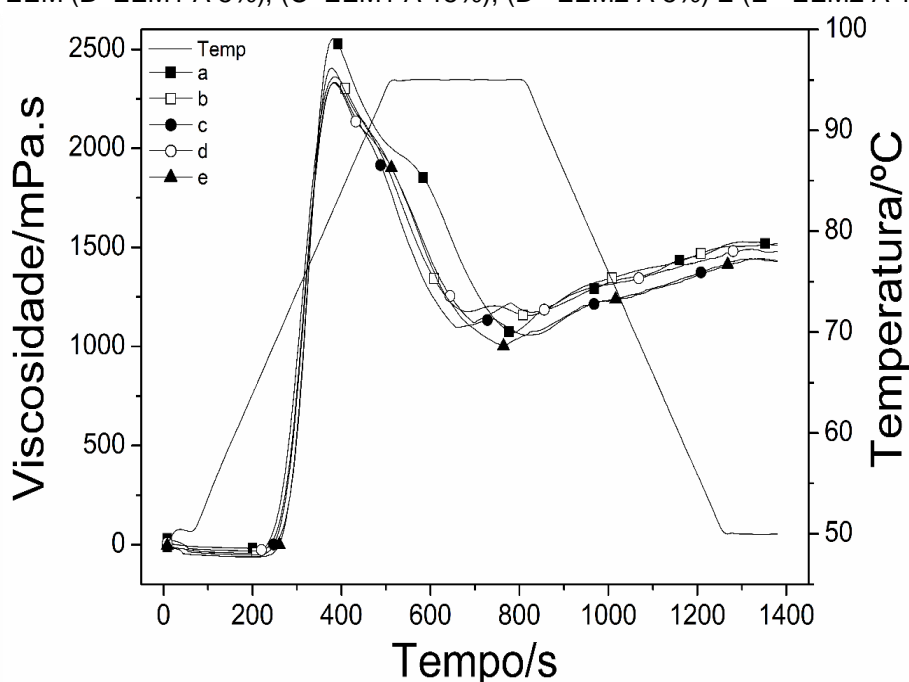
As propriedades de pasta do amido de milho ceroso modificado com ácido láctico 1,0M nas temperaturas de 20°C e 40°C foram avaliadas por Lemes e colaboradores (2014). O tratamento promoveu uma diminuição na viscosidade de pico e viscosidade final, com maior diferenças em relação ao nativo observadas para temperatura de 40°C.

TABELA 19 - RESULTADOS RVA AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO NATIVO (A) E INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

| Amostra | Temperatura de Pasta (°C) | Viscosidade de Pico (cP) | Tempo de Pico (seg) | Tendência a Retrogradação (cP) | Quebra (cP) | Viscosidade Final (cP) |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| A | 70.75±0.01 ^a | 2980.86±0.20 _a | 368.10±0.42 ^b | 360.25±0.35 ^d | 1785.50±0.71 ^a | 1557.00±1.41 ^a |
| B | 70.30±0.01 ^c | 2600.65±0.92 _b | 364.60±0.57 ^c | 415.50±0.71 ^b | 1492.16±0.22 ^c | 1524.30±0.42 ^b |
| C | 70.65±0.01 ^b | 2500.00±0.07 _e | 367.84±0.05 ^b | 399.00±0.07 ^c | 1485.13±0.18 ^d | 1414.50±0.71 ^e |
| D | 70.34±0.02 ^c | 2523.75±1.06 _c | 376.23±0.04 ^a | 327.25±0.35 ^e | 1383.50±0.71 ^e | 1467.15±0.21 ^c |
| E | 70.75±0.01 ^a | 2512.00±2.83 _d | 364.10±0.14 ^c | 438.35±0.49 ^a | 1528.50±0.71 ^b | 1423.30±0.42 ^d |

Os perfis reológicos das amostras nativa e tratadas com extrato aquoso de erva-mate estão representados na Figura 30. Perfis semelhantes foram encontrados para amidos nativos e modificados em outros trabalhos, como no caso do amido de milho ceroso modificado com HCl onde ocorreu diminuição da viscosidade de pico, em contrapartida houve um aumento do tempo de pico. A tendência a retrogradação e a viscosidade final diminuíram (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

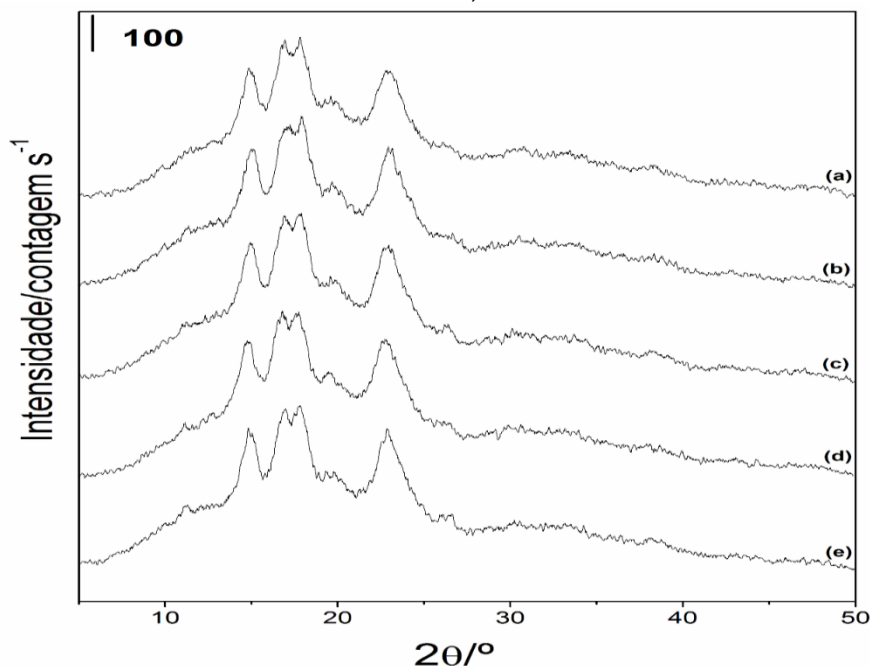
FIGURA 30 - CURVAS RVA PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).



3.3.5 DIFRATROMETRIA DE RAIOS X

Os padrões dos difratogramas de Raios X entre o amido de milho ceroso (A) e os amidos tratados com extrato aquoso de erva-mate (B, C, D, E) foram comparados, sendo mostrados na Figura 31 e o grau de cristalinidade relativa está apresentado na Tabela 20.

FIGURA 31 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



A partir dos dados apresentados na Tabela 20 foi possível verificar que ocorreu uma diminuição da cristalinidade na amostra (B) e um aumento da cristalinidade nas outras amostras tratadas (C, D, E), não havendo diferença significativa entre as amostras pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

MIAO *et al.* (2011) encontraram um aumento da cristalinidade no amido de milho ceroso após hidrólise ácida das amostras. Os valores de cristalinidade relativa estão próximos dos encontrados por OLIVEIRA *et al.* (2014). Em geral a diferença de cristalinidade entre os amidos poderia ser atribuída por alguns parâmetros como tamanho do cristal, número de regiões cristalinas, orientação das duplas hélices dentro dos domínios cristalinos e extensão da interação entre as duplas hélices (MIAO; ZHANG; JIANG, 2009; SRICHUWONG; JANE, 2007)

TABELA 20 - GRAU DE CRISTALINIDADE RELATIVA PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE

EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%)

| AMOSTRA | GRAU DE CRISTALINIDADE RELATIVA (%) |
|---------|-------------------------------------|
| (A) | $23,2 \pm 0,10^a$ |
| (B) | $23,2 \pm 0,25^a$ |
| (C) | $23,8 \pm 0,53^a$ |
| (D) | $23,5 \pm 0,70^a$ |
| (E) | $23,9 \pm 0,38^a$ |

Os amidos de milho ceroso nativo e modificados apresentaram padrão cristalográfico do tipo A de acordo com a classificação de ZOBEL (1964), com picos em 15° , 17° e 23° em 2θ . Os picos dos difratogramas de raios X estão apresentados na Tabela 21. Os dados encontrados estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (KUAKPETOON; WANG, 2006; WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009; MATTA JÚNIOR, 2015).

TABELA 21 - PICOS OBTIDOS POR MEIO DOS DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

| AMOSTRAS | PICOS ($^\circ$) em 2θ |
|----------|---------------------------------|
| (A) | 14,82 16,76 22,84 |
| (B) | 14,94 16,94 22,84 |
| (C) | 14,94 16,96 22,96 |
| (D) | 14,9 17,06 22,96 |
| (E) | 14,84 16,98 22,86 |
| | |

HIZURUKI (1985) estudou a correlação entre o tamanho e arranjo das cadeias de amilopectina e a estrutura cristalina dos grânulos de amido. Este pesquisador concluiu que as amilopectinas do amido tipo A têm em média uma proporção maior de moléculas com cadeias curtas do que as amilopectinas dos amidos tipo B.

SHI *et al.* (1998) mostraram que a amilopectina do amido ceroso e comum tem uma proporção maior de moléculas com cadeias curtas (ramificações) e estes amidos possuem um padrão de difração do tipo A. No entanto, o amido com alto teor de amilose apresentou uma proporção maior de cadeias longas nas suas frações ramificadas e apresentou um padrão tipo B. O fato de os amidos apresentarem padrões de difração diferentes é um indicativo de que eles possuem uma diferença na estruturação da dupla hélice que forma o cristal, e isto define suas propriedades funcionais. Uma cristalinidade menor não é necessariamente sinônimo de menor ordenação molecular nos grânulos e sim um indicativo do menor tamanho dos cristais.

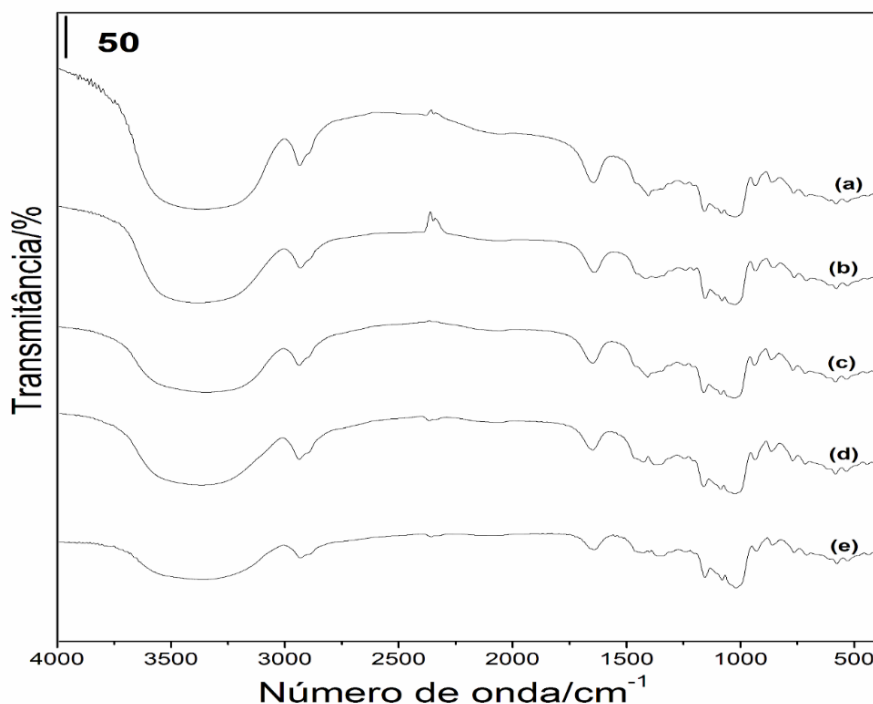
3.3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho tem sido amplamente utilizada para verificar possíveis mudanças estruturais em amido modificados a nível molecular (MANO *et al.*, 2003; RAPHAEL, 2006; KUHNEN *et al.*, 2010).

A Figura 32 mostra o espectro no infravermelho do amido de milho ceroso nativo e dos amidos modificados. As bandas entre as regiões de 2900 a 3000 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H do grupo metila. A banda de 1325 a 1462 cm^{-1} pertence à deformação angular da ligação C-H; de 950 a 1153 cm^{-1} aparecem os estiramentos de álcoois secundários e primários e de éteres C-O-C presentes nas cadeias poliméricas do amido (KAEWTATIP; TANATTANAKUL, 2008).

Nos picos entre 990 e 1060 cm^{-1} as informações podem ser atribuídas à vibração O-C (DEMIANTE; CEREDA, 2000; HUANG *et al.*, 2006). A banda em 1047 cm^{-1} corresponde a parte ordenada ou cristalina do amido, enquanto a parte amorfa ou desordenada é característica na banda de 1022 cm^{-1} (SMITS *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2007).

FIGURA 32 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (4.000- 400 cm^{-1}) DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



A espectroscopia no infravermelho mostra-se sensível às mudanças na estrutura molecular do amido, tais como: conformação da cadeia helicoidal, cristalinidade, fenômeno de retrogradação e conteúdo de água.

As bandas na região de 2900-3000 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-H, em 1163, 1150, 1124 e 1103 cm^{-1} tem-se ao estiramento C-O e C-C com alguma contribuição do estiramento C-OH. As bandas em 1077, 1067, 1047, 1022, 994 e 928 cm^{-1} são atribuídas às deformações C-OH e CH_2 . (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

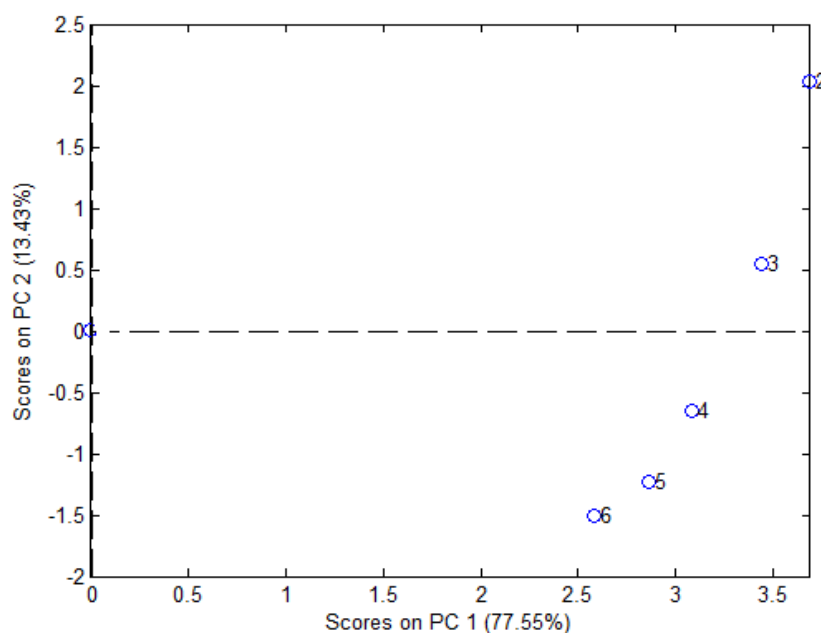
Analisando os espectros da Figura 32 foi observado um pico em todas as amostras entre 2750 e 3000 cm^{-1} , sendo mais acentuado no amido nativo. Este pico pode ser relacionado as ligações C-H. A amostra (B) apresentou um pico em torno de 2250 cm^{-1} , causado devido a alguma interferência externa durante a análise. Os picos entre 1250 a 750 cm^{-1} estão relacionados aos estiramentos de álcoois secundários e primários e de éteres C-O-C presentes nas cadeias poliméricas do amido.

As amostras deste estudo possuem estruturas semelhantes e grupos funcionais iguais. Estas semelhanças estruturais fazem com que o espectro FTIR dos amidos seja muito semelhante. Estas características impossibilitam a

diferenciação das amostras apenas pela análise visual dos espectros. A Análise por Componentes Principais (PCA) foi a ferramenta analítica empregada com o intuito de diferenciar o amido de milho ceroso nativo e os amidos modificados. Esta análise foi realizada inicialmente pelo processamento dos dados da transmitância de toda faixa espectral do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1} , conforme mostra a Figura 32) utilizando o programa Matlab versão 7.0 (Mathworks Inc.). Vários pré-processamentos espectrais foram testados, sendo a melhor discriminação obtida através da aplicação de segunda derivada. A primeira componente principal (PC1) descreve 77,45% da variância dos dados, enquanto a segunda componente principal (PC2) explica 13,43%. A Figura 34 apresenta o gráfico de scores da PC1 versus a PC2.

As amostras na Figura 33 são representadas pelos números 2, 3, 4, 5 e 6 que representam respectivamente as amostras A, B, C, D e E. O amido nativo se encontra distante das outras amostras. A amostra B é a amostra que menos sofreu variação no espectro FTIR em relação ao amido ceroso. Através da Figura 33 é possível verificar que as amostras B, C, D e E apresentam características espectrais semelhantes.

FIGURA 33 – GRÁFICO DE SCORES DO PCA NA ANÁLISE DO AMIDO DE MILHO CEROSO NATIVO (A ou 2) E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (B ou 3=EEM1 A 5%), (C ou 4=EEM1 A 15%), (D ou 5= EEM2 A 5%) E (E ou 6= EEM2 A 15%).

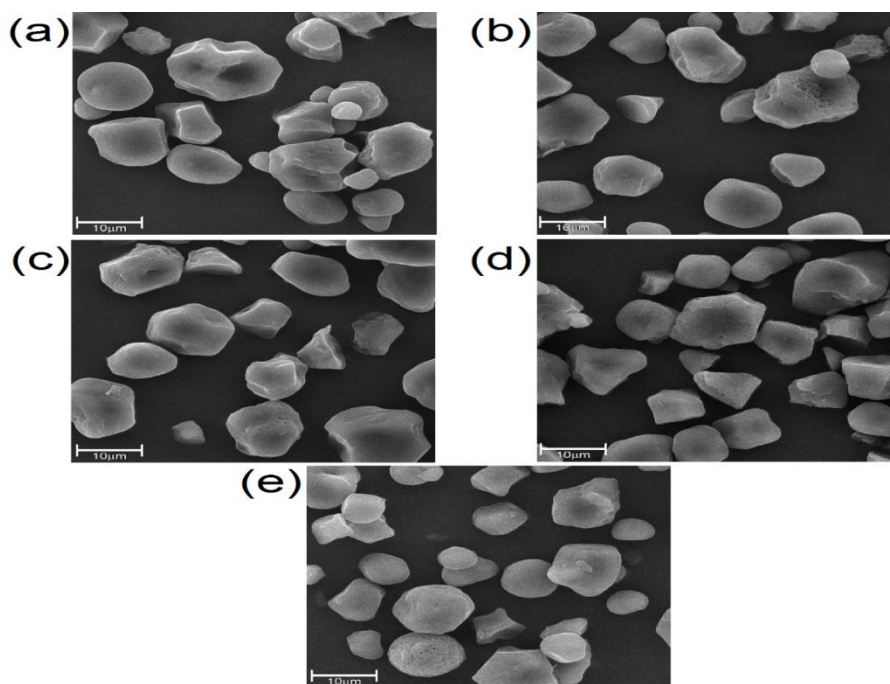


3.3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através das micro-imagens obtidas no MEV, apresentadas na Figura 34, foi possível observar a morfologia dos grânulos e calcular o diâmetro médio das amostras que foram respectivamente: (A) $13,69 \pm 3,42 \mu\text{m}$, (B) $13,62 \pm 1,76 \mu\text{m}$, (C) $13,86 \pm 1,96 \mu\text{m}$, (D) $13,83 \pm 2,96 \mu\text{m}$, e (E) $13,93 \pm 2,13 \mu\text{m}$. Não houve diferença significativa entre os diâmetros médios das amostras pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

O formato do grânulos condiz ao encontrado por Miao *et al.* (2011) e Oliveira *et al.* (2014). Alguns grânulos eram de formato irregular e porosos. Os poros na superfície dos grânulos são canais que fornecem um canal ao interior do grânulo (HUBER; BEMILLER, 2000).

FIGURA 34 – MICRO-IMAGENS OBTIDOS NO MEV DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



3.4. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos de erva-mate foram incorporados ao amido de milho ceroso nas concentrações de 5 e 15%. A determinação de compostos fenólicos totais verificou que parte do conteúdo fenólico foi incorporado no amido

nativo, sendo que os extratos que apresentavam maior concentração (15%) incorporaram maior teor fenólico.

As análises TG/DTG apresentaram três perdas de massa consecutivas. Onde foi observado que a incorporação de compostos fenólicos elevou a estabilidade térmica do amido de milho ceroso, porque retardou o início da segunda perda de massa que corresponde à decomposição da cadeia principal do carbono. Na análise de DSC observou-se uma diminuição da ΔH_{gel} após a incorporação.

A análise de RVA mostrou uma diminuição na viscosidade de pico e viscosidade final em todas as amostras tratadas, e a amostra (D) apresentou menor tendência a retrogradação. As micro-imagens (MEV) possibilitaram o estudo da estrutura e a superfície dos grânulos de amido, onde foi verificada que não houve diferença entre os diâmetros médios das amostras.

Os dados obtidos a partir dos difratogramas de raios X das amostras (A, B, C, D, E) apresentaram padrão cristalográfico do tipo A, com picos em 15° , 17° e 23° em 2θ . Foi observado também que ocorreu um aumento da cristalinidade das amostras tratadas em relação ao amido nativo.

Os dados obtidos no FTIR foram submetidos a uma análise de PCA, onde foi verificado que as amostras tratadas se diferem da amostra nativa, caracterizando uma mudança na estrutura do amido.

A incorporação de extratos aquosos de erva-mate para modificação das características estruturais e térmicas do amido de milho ceroso, bem como suas propriedades de pasta, pode ser uma proposta promissora para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, agregando valor devido aos benefícios ofertados pela presença de compostos fenólicos.

CAPÍTULO IV

EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, REOLÓGICAS E ESTRUTURAIS NO AMIDO DE MILHO COMUM

RESUMO

O amido é um carboidrato de reserva das plantas, sendo o amido de milho muito explorado industrialmente. O amido de milho pode ser classificado de acordo com o teor de amilose, em comum (sendo composto de amilose e amilopectina) e ceroso (predomina a amilopectina). A erva-mate apresenta em sua composição química compostos fenólicos, que apresentam acentuada capacidade antioxidante. As propriedades térmicas, reológicas e estruturais do amido de milho comum tratados com extratos de erva-mate foram avaliadas. As análises de TG/DTG mostraram que ocorreu um aumento da estabilidade térmica das amostras de amido incorporadas de polifenóis. A análise por DSC revelou que ocorreu uma diminuição dos valores de entalpia de gelatinização, menos para a amostra (D). Nas curvas RVA pode-se observar que os amidos tratados com extrato de erva-mate (C, D E) apresentaram um aumento da viscosidade de pico e da viscosidade final. Os difratogramas de raios X mostraram que as amostras apresentaram padrão tipo A, com um aumento do grau de cristalinidade relativa após o tratamento. Pela análise de FTIR foi verificado que ocorre mudança estrutural das amostras tratadas, onde o PCA mostrou diferença entre o amido nativo e as amostras tratadas com extrato de erva-mate. As micro-imagens obtidas por MEV revelaram o diâmetro médio dos grânulos de amido bem como na observação do formato dos mesmos.

4.1 INTRODUÇÃO

Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta muito cultivada e apreciada na América do Sul, sendo normalmente consumida na forma de chimarrão e chá (CARDOZO *et al.*, 2007; PAGLIOSA *et al.*, 2010). No Brasil, o consumo per capita atinge valores próximos de 1,2 kg por ano, o que é favorável devido aos efeitos benéficos da erva-mate sobre a saúde humana (MENINI *et al.*, 2007).

Na composição química da erva-mate encontramos compostos fenólicos, entre eles a rutina, ácido caféico e ácido 5-CQA (CANSIAN *et al.*, 2008). O consumo de compostos fitoquímicos, entre eles os compostos fenólicos, tem ganhado atenção devido aos potenciais benefícios à saúde, como capacidades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias (SHAHIDI; NACZK, 2004; SHAHIDI *et al.*, 2008). Estudos experimentais mostram que o

consumo regular de compostos fitoquímicos está relacionado com a diminuição do risco de doenças crônicas como câncer, doenças cardíacas e diabetes (BAO; FENWICK, 2004; LIU, 2004; SHAHIDI; NACZK, 2004; FRESCO *et al.*, 2006; HAN; SHEN; LOU, 2007).

Muitas ervas, especiarias e seus extratos são utilizadas juntamente com alimentos ricos em amido, como arroz, trigo, principalmente nos países asiáticos, como corantes, aromatizantes e agentes de conservação (NAKATANI, 1994; SHAN *et al.*, 2007). Os efeitos dos compostos fenólicos nas propriedades dos amidos vem sendo estudados, com a finalidade de avaliar sua influência na estabilidade térmica, estrutural e reológica dos amidos (WU *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009; ZHU; WANG, 2012).

O amido é a principal substância de reserva em plantas, sendo obtido de sementes, raízes e tubérculos. O amido de milho comum se caracteriza pela formação de um gel consistente, é bastante utilizado em sopas desidratadas e molhos que requerem viscosidade a quente. Os amidos nativos apresentam algumas limitações tecnológicas, sendo assim a produção de amidos modificados é uma alternativa para aumentar a utilização deste polímero nas aplicações industriais (WURZBURG, 1986; LEONEL; JACKEY; CEREDA, 1998).

A modificação de amidos nativos pode ser realizada por processos físicos, tratamento térmico, exposição a radiações, processos enzimáticos ou processos químicos. Estas modificações alteram profundamente a gelatinização dos grânulos de amido nativo, assim como seu comportamento quando na forma de pasta e sua retrogradação (GUILBOT; MERCIER; STARCH, 1985; BEMILLER, 1997).

O objetivo deste trabalho foi investigar a interação entre o amido de milho comum e extratos de erva-mate, por meio da análise das propriedades térmicas, estruturais e de pasta do amido.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 INCORPORAÇÃO DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA MATE NO AMIDO

Os extratos alcóolicos de erva-mate foram incorporados no amido de milho comum. Para cada uma das amostras de erva-mate (1 e 2), foi realizada uma infusão a frio (temperatura ambiente) de erva-mate em etanol, nas proporções de 5g e 15g de erva-mate em 100 mL de etanol 99,5% por 48 horas. Em seguida, cada uma das amostras foi filtrada em papel filtro simples e o filtrado foi recuperado. A torta retida no filtro foi descartada. O filtrado foi transferido para béqueres de 100 mL aos quais foram adicionados 20 g de amido de milho comum. Cada suspensão foi mantida sob agitação durante 10 minutos a temperatura ambiente, para homogeneização e interação dos compostos. A descrição das amostras de erva-mate utilizadas está apresentada na Tabela 22.

TABELA 22 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO 5-CQA, AC, RUTINA E CFT DAS AMOSTRAS 1 E 2 DE ERVA-MATE DETERMINADOS POR HPLC.

| Amostra | Município | Safra | 5-CQA | AC | Rutina | CFT |
|---------|-------------------|-------|--------|------|--------|--------|
| 1 | São Mateus do Sul | 2013 | 13,614 | 1,36 | 2,95 | 17,917 |
| 2 | São Mateus do Sul | 2014 | 13,38 | 1,37 | 3,28 | 18,028 |

AC – Ácido caféico

CFT – Conteúdo fenólico Total

5CQA – Ácido 5-Cafeoilquínico

Após a incorporação dos extratos ao amido as amostras foram codificadas da seguinte maneira: (A): amido nativo; (B) amido incorporado com extrato de erva-mate 1 na concentração de 5%; (C): amido incorporado com extrato de erva-mate 1 na concentração de 15%; (D): amido incorporado com extrato de erva-mate 2 na concentração de 5%; (E): amido incorporado com extrato de erva-mate 2 na concentração de 15%.

A solução foi filtrada sendo o material retido no filtro seco em estufa de circulação forçada a 40°C por 24 horas. As amostras foram moídas em moinho de corte e armazenadas em dessecador até o momento das análises.

3.2.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

3.2.2.1 *Extração dos compostos fenólicos das amostras*

Para extração dos compostos fenólicos das amostras de amido modificado foi utilizada uma solução extratora composta por 80 mL de álcool, 20 mL de água destilada e 1 mL de ácido fórmico 3%. Em um tubo de fuga, foi adicionado 1 g da amostra e 10 mL da solução extratora, a solução foi agitada e deixada no freezer por 24 horas. Após esse tempo, a solução foi centrifugada por 20 minutos, onde o sobrenadante foi coletado e colocado em uma balão volumétrico de 25 mL. Foi adicionada mais 10 mL da solução extratora, no tubo que continha a amostra, sendo esta centrifugada novamente por 20 minutos. O sobrenadante foi colocado no balão e o volume completado para 25 mL com água destilada.

4.2.2.2. *Quantificação dos compostos fenólicos*

Para determinação do teor de compostos fenólicos totais foram adicionados 0,4 mL da amostra em um tubo de ensaio, 8,4 mL de água destilada, 0,5 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de Na_2CO_3 . A solução foi homogeneizada deixada em repouso por 60 minutos, sendo então realizada a leitura da solução em espectrofotômetro em 720 nm. O padrão utilizado foi o Ácido Gálico.

4.2.3 TERMOGRAVIMETRIA / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidos usando o sistema de análise térmica TGA-50 (Shimadzu), em que as amostras foram aquecidas 30-650°C usando cadinhos de alumina com aproximadamente 7-10 mg de amostra, sob um fluxo de ar 150 mL min^{-1} e em uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. O instrumento foi previamente calibrado com oxalato de cálcio mono-hidratado. Todas as porcentagens de perdas de massa foram calculadas pelo software TA-60 WS. As curvas de termogravimetria derivada (DTG) foram calculadas com o

software e utilizadas para a determinação das temperaturas de pico de perda de massa.

4.2.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas DSC foram feitas no equipamento DSC-Q200 (TA-Instruments, EUA). Preparou-se soluções com 2,5 mg de amido, e com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 10 μL de água, para que a proporção fosse 1:4 (amido:água). Os cadinhos de alumínio usados foram selados para se observar o fenômeno de gelatinização. A suspensão ficou em repouso por 1 h para equilibrar a umidade.

As condições do equipamento foram: razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de ar de 50 mL min^{-1} . O equipamento utilizado foi previamente calibrado com um padrão de índio 99,99 % (Ponto de fusão = $156,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\Delta H_{\text{fus}} = 28,50\text{ J g}^{-1}$).

4.2.5 PROPRIEDADES DE PASTA

As curvas de propriedade de pasta (RVA) foram obtidas por meio de um viscosímetro RVA-4 (Newport Sci., Austrália). Para a análise preparou-se uma suspensão de 2,24 g de amido em base seca, junto a 25,76 g de água destilada.

A suspensão preparada foi submetida a uma agitação rotacional de 160 rpm e aquecimento contínuo de 50 a 95°C a uma taxa de $6^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A temperatura foi mantida a 95°C durante 5 min, e então resfriada até $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ novamente. Todo o processo teve uma duração de 23 minutos. O software utilizado para obtenção dos dados e das curvas foi o Thermocline for Windows (TCW).

4.2.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

As amostras foram analisadas no Difrátômetro de raios-X Ultima 4 (Rigaku, Japão). Cada amostra foi depositada sobre um suporte de vidro e exposta a radiação $\text{CuK}\alpha$ (comprimento de onda de 1.541 \AA) submetidas a 40

kV e corrente de 30 mA. A radiação dispersa foi detectada na faixa angular de 5-50 ° (2θ), com tempo de varredura de 2 ° min⁻¹ e uma etapa de 0.02 °.

4.2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada por meio de um espectrofotômetro Shimadzu FT-IR 8400 (Shimadzu, Japan). As curvas foram realizadas a uma resolução de 4 cm⁻¹, com 64 escaneamentos. Os espectros foram obtidos utilizando pastilhas contendo uma mistura homogênea de 100 mg de KBr seco e 2 mg da amostra seca. Os espectros foram obtidos no comprimento de onda de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no equipamento VEGA3 (TESCAN). A escala de leitura foi de 20 µm, com 20 kV de tensão no feixe de elétrons, filamento de tungstênio e detector de elétrons retro-espelhado. O equipamento se baseia na passagem de elétrons através da amostra, previamente preparada, desse modo, inicialmente a amostra foi fixada em uma fita adesiva de carbono e é preparada pelo processo de metalização com plasma de ouro e paládio. A leitura da imagem se dá a partir do detector de elétrons, o microscópio eletrônico, que registra as imagens e as transmite a um software instalado no computador acoplado ao equipamento.

4.2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram utilizados para comparar as médias amostrais com nível de confiança de 95% (p 0,05). A análise estatística foi realizada utilizando o software Origin 8.0®, sendo realizada em triplicata.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais analisados nas amostras de amido de milho modificados com extratos de erva-mate estão apresentados na Tabela 23.

TABELA 23 - RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA COMPOSTOS FENÓLICOS NAS AMOSTRAS DE AMIDOS ANALISADAS (ppm de ácido gálico)

| Amostra | Teor de compostos fenólicos Totais (ppm de ácido gálico) |
|--------------------------------|---|
| Amostra | Não detectado |
| A = (amido nativo) | 2148 |
| B=(amido + EA erva-mate1 - 5%) | 2519 |
| C=(amido + EA erva-mate1-15%) | 2488 |
| D=(amido + EA erva-mate2 - 5%) | 2795 |

EA = Extrato Alcoólico

Analisando os resultados da Tabela 23 foi verificado que as amostras de amido incorporadas com extrato alcoólico de erva-mate apresentam teores de compostos fenólicos maiores que os encontrados para as amostras de amido ceroso incorporadas de extrato aquoso (Tabela 16). As amostras tratadas com concentrações maiores de erva-mate (15%) apresentaram maior teor de compostos fenólicos.

4.3.2 TERMOGRAVIMETRIA/ TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

Os resultados TG/DTG para o amido de milho comum e para as amostras que foram tratadas com extrato de erva-mate estão apresentados na Tabela 24. As perdas de massa das amostras ocorreram em três etapas. A primeira perda de massa correspondeu perda de compostos voláteis, em especial a água, determinando assim a umidade das amostras. A umidade das amostras, obtida pelo TG foram: (A) 9,91%, (B) 10,15%, (C) 8,78%, (D) 9,85% e (E) 11,39%.

A segunda e a terceira perda de massa, ocorreram de forma consecutiva, devido à decomposição e oxidação da matéria orgânica até a formação de cinzas. As cinzas encontradas para as amostras foram: (A) 0,82 %, (B) 0,3%, (C) 0,34%, (D) 0,35% e (E) 0,27%. O teor de cinzas encontrados para as amostras foram condizentes com outros trabalhos da literatura (BENINCA *et al.*, 2008)

TABELA 24 - RESULTADOS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

| Amostra | Resultados TG/DTG | | | |
|---------|-------------------|---------------|---------------------------|----------------------|
| | Etapas | $\Delta m/\%$ | $\Delta T/^\circ\text{C}$ | $T_p/^\circ\text{C}$ |
| (A) | 1 ^o | 9.91 | 30-133 | 62.41 |
| | Estabilidade | - | 133-234 | - |
| | 2 ^o | 69.99 | 234-393 | 285.49 |
| | 3 ^o | 19.28 | 393-530 | 462.92 |
| (B) | 1 ^o | 10.15 | 15-136 | 71.68 |
| | Estabilidade | - | 136-245 | - |
| | 2 ^o | 65.24 | 245-381 | 263.26 |
| | 3 ^o | 24.31 | 381-567 | 459.84 |
| (C) | 1 ^o | 8.78 | 29-135 | 74.64 |
| | Estabilidade | - | 135-241 | - |
| | 2 ^o | 65.48 | 241-393 | 261.63 |
| | 3 ^o | 25.40 | 393-560 | 459.58 |
| (D) | 1 ^o | 9.85 | 20-141 | 73.26 |
| | Estabilidade | - | 134-239 | - |
| | 2 ^o | 65.61 | 239-392 | 267.62 |
| | 3 ^o | 24.19 | 392-591 | 455.46 |
| (E) | 1 ^o | 11.39 | 20-120 | 65.47 |
| | Estabilidade | - | 120-225 | - |
| | 2 ^o | 67.22 | 225-381 | 268.79 |
| | 3 ^o | 21.12 | 381-525 | 450.47 |

Δm , perda de massa (%); ΔT , diferença de temperatura ($^\circ\text{C}$); T_p , temperatura de pico ($^\circ\text{C}$).

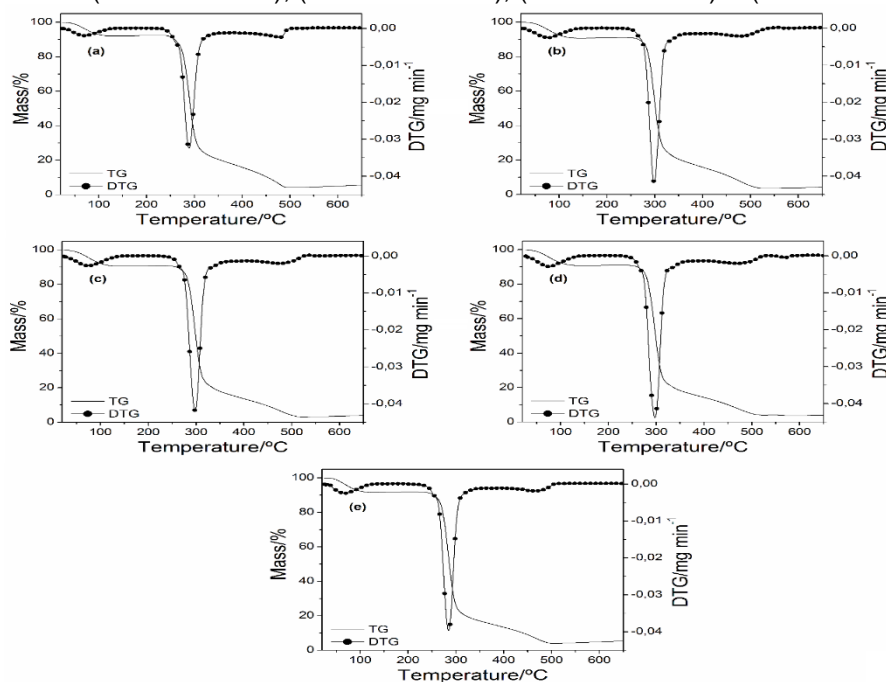
As amostras tratadas demonstraram semelhanças entre si, apresentando uma diminuição de perda de massa na segunda etapa e temperaturas menores de conclusão que o amido nativo. Durante a terceira

etapa de perda de massa ocorreu um aumento nas temperaturas de conclusão após a incorporação dos extratos. As amostras tratadas apresentaram menor estabilidade térmica pois iniciaram a segunda perda de massa, correspondente à degradação da matéria orgânica em uma temperatura mais elevada. Beninca e colaboradores (2008) avaliaram a modificação do amido de milho comum com HCl, em diferentes temperaturas, onde os resultados encontrados para a análise TG mostraram que a temperatura inicial da segunda perda de massa foi muito superior a este trabalho, ou seja, as temperaturas foram acima de 278°C.

As diferenças nas temperaturas iniciais e finais para cada etapa da perda de massa mostra que a incorporação dos compostos fenólicos provocou alterações nas propriedades térmicas, para perda de massa, das amostras.

A Figura 35 ilustra as curvas TG/DTG das amostras analisadas. As curvas DTG possibilitaram a determinação da temperatura de pico, ou seja, a temperatura onde a velocidade de perda de massa foi máxima. As amostras apresentaram maior perda de massa em torno de 300°C. Analisando outros trabalhos semelhantes da literatura para o amido de milho comum e amido de mandioca, os resultados encontrados foram semelhantes (BENINCA et al., 2008).

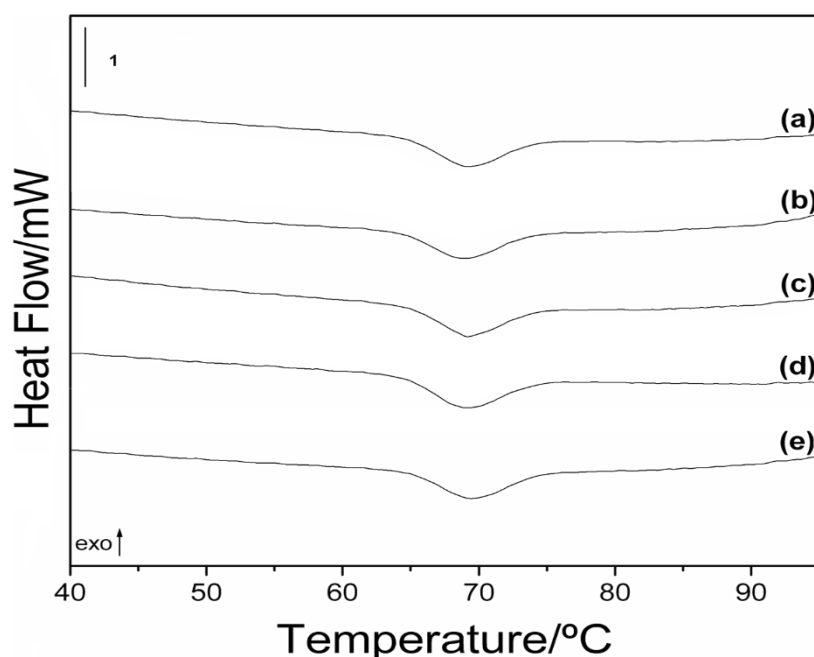
FIGURA 35 - CURVAS TG/DTG DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



3.3.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC foram realizadas para avaliar o processo de gelatinização dos amidos modificados com extrato de erva-mate. A Figura 36 mostra as curvas de DSC para a amostra de milho nativa (A) e as amostras tratadas (B, C, D, E).

FIGURA 36 – CURVAS DSC DO AMIDO DE MILHO COMUM NATIVO (A) E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



Avaliando a Figura 36 foi observado que todas as amostras apresentaram um pico endotérmico, onde a área deste pico corresponde a entalpia de gelatinização do amido. As curvas de gelatinização do amido iniciaram-se 64 e 65°C e concluíram-se entre 73 e 74°C.

A Tabela 25 mostra os resultados de DSC obtidos e como pode ser observado a introdução de compostos fenólicos afetou as propriedades de gelatinização do amido de milho comum. Foram avaliadas as Temperaturas de início e conclusão da curva de gelatinização, bem como a temperatura de pico e a variação da entalpia de gelatinização. Durante a primeira transição endotérmica, comparado com o amido nativo (A), a amostra (B) apresentou temperatura inicial e entalpia de gelatinização menor. Enquanto as amostras C, D e E apresentaram temperatura inicial mais elevada que o amido nativo.

Somente a amostra D apresentou entalpia de gelatinização maior que o amido nativo.

Resultados semelhantes foram encontrados para o amido de milho modificado (LEMES *et al*, 2014) e para amido de trigo modificado com compostos fitoquímicos (ZHU *et al.*, 2009).

Beninca *et al.* (2008) ao analisar as propriedades térmicas do amido de milho comum nativo e modificado com HCl, verificaram que após o tratamento, as amostras de amido apresentaram valores mais baixos de T_o , T_p , T_c e entalpia de gelatinização.

A incorporação de compostos fenólicos ou polifenóis ao amido de milho comum não provocou mudanças na suas propriedades térmicas, sendo este fator esperado, visto que os compostos fenólicos foram adicionados com a finalidade de tornar o amido um produto fitoquímico.

TABELA 25 - RESULTADOS DSC PARA AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

| Amostra | DSC gelatinização | | | |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| | $T_o/^{\circ}\text{C}$ | $T_p/^{\circ}\text{C}$ | $T_c/^{\circ}\text{C}$ | $\Delta H_{\text{gel}}/\text{J g}^{-1}$ |
| (A) | 64.90±0.02 ^b | 69.04±0.01 ^c | 73.64±0.01 ^b | 3.27±0.03 ^b |
| (B) | 64.27±0.01 ^d | 69.02±0.01 ^c | 73.47±0.01 ^d | 3.07±0.01 ^c |
| (C) | 65.17±0.01 ^a | 69.11±0.02 ^b | 73.57±0.01 ^c | 3.19±0.01 ^{bc} |
| (D) | 64.72±0.01 ^c | 69.12±0.03 ^b | 73.35±0.01 ^e | 3.43±0.02 ^a |
| (E) | 65.13±0.08 ^a | 69.42±0.01 ^a | 73.88±0.02 ^a | 3.16±0.11 ^{bc} |

(*) T_o “onset” temperatura inicial, T_p temperatura de pico, T_c temperatura de conclusão, ΔH_{gel} entalpia de gelatinização. Medidas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$).

3.3.4 PROPRIEDADES DE PASTA

A Tabela 26 mostra os valores obtidos no RVA para as amostra de milho comum nativo e tratadas. Analisando estes valores observou-se uma diminuição de viscosidade de pico para todas as amostras tratadas. Em relação à viscosidade final, somente ocorreu diminuição na amostra (B). A tendência de

retrogradação aumentou após o tratamento das amostras, somente ocorrendo uma leve diminuição na amostra (B). As amostras tratadas apresentam valores de quebra maiores que para o amido nativo nas amostras (C, D, E).

A estrutura química dos compostos fenólicos bem como as características das amostras de erva-mate apresentaram influência nas propriedades de pasta dos amidos modificados, tais mudanças foram comprovadas através das mudanças dos parâmetros obtidos por RVA.

Os perfis reológicos das amostras nativa e tratadas com extrato aquoso de erva-mate estão representados na Figura 37.

FIGURA 37- CURVAS RVA PARA AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).

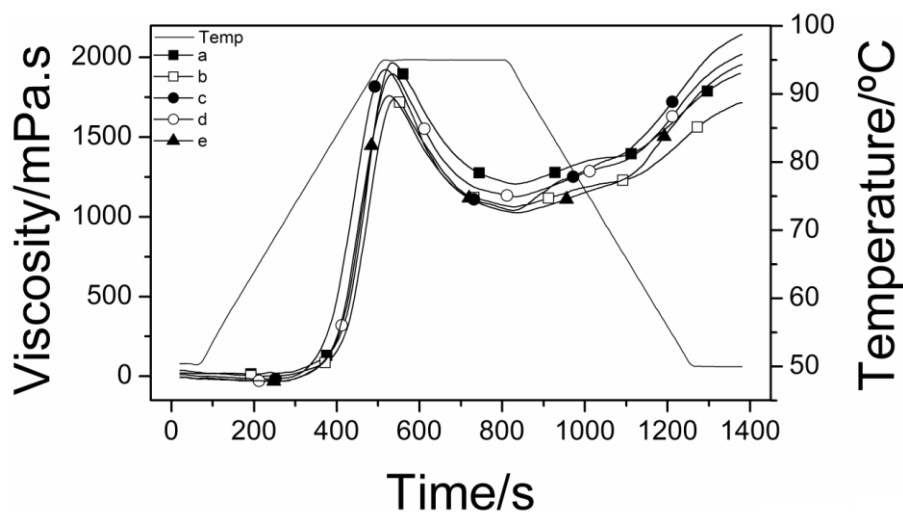


TABELA 26 - RESULTADOS RVA DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

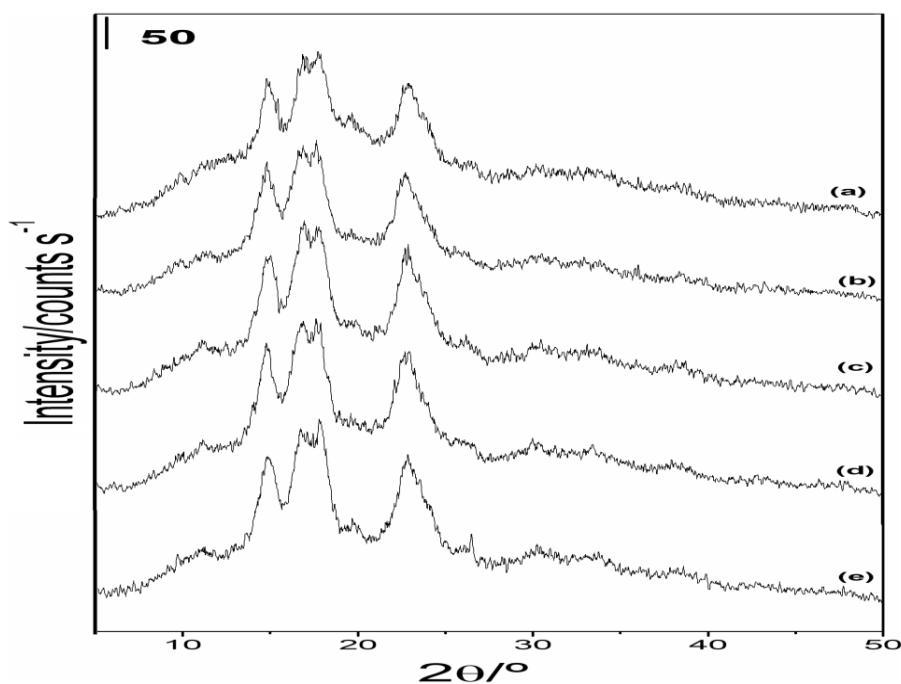
| Amostra | Temperatura de Pasta/°C | Viscosidade de Pico/mPa.s | Tendência a Retrogradação/mPa.s | Quebra/mPa.s | Viscosidade Final/mPa.s | Tempo de Pico/s |
|---------|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| (A) | 82.90±0.07 ^b | 1970.30±0.42 ^a | 699.55±0.78 ^d | 766.15±0.21 ^c | 1903.60±0.85 ^d | 535.65±0.21 ^a |
| (B) | 83.63±0.04 ^a | 1744.25±0.35 ^e | 659.50±0.71 ^e | 684.18±0.25 ^e | 1719.25±0.35 ^e | 535.95±0.21 ^a |
| (C) | 78.08±0.04 ^d | 1930.50±2.12 ^b | 1109.25±1.77 ^a | 890.08±0.11 ^a | 2148.00±1.41 ^a | 511.90±0.14 ^d |
| (D) | 81.58±0.04 ^c | 1903.80±0.28 ^c | 898.50±0.71 ^c | 780.55±0.78 ^b | 2021.15±1.20 ^b | 528.25±0.35 ^b |
| (E) | 81.54±0.02 ^c | 1765.50±0.71 ^d | 930.63±0.53 ^b | 740.40±0.57 ^d | 1956.05±0.07 ^c | 523.90±0.14 ^c |

Na literatura foram encontrados trabalhos que avaliaram as propriedades de pasta no amido de milho comum. Lemes *et al.* (2012) avaliaram as propriedades de pasta do amido de milho comum modificado com ácido lático e houve uma diminuição nos parâmetros de viscosidade. Porém, para a modificação do ácido lático a 20°C houve um aumento e semelhança com a amostra de amido ceroso modificado com ácido lático. Os autores verificaram uma diminuição na viscosidade de pico e final devido à hidrólise provocada pela ação do ácido lático, com maiores diferenças para as amostras de milho normal e ceroso a 40°C.

3.3.5 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

As amostras de amido de milho comum nativo e tratadas com extrato de erva-mate foram submetidas as análises de difratometria de raios X, onde os padrões encontrados estão apresentados na Figura 38.

FIGURA 38 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DAS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM NATIVO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



Na Tabela 25 estão apresentados os dados do grau de cristalinidade relativa para as amostra de amido de milho nativo (A) e tratadas (B, C, D e E).

Analisando os dados da Tabela 27 foi verificado que ocorreu aumento no grau de cristalinidade dos amidos modificados, onde de acordo com o Teste de Tukey a 5% de significância as amostras A e D apresentam diferenças significativas entre si e entre as demais amostras. O aumento da cristalinidade pode ter ocorrido devido à presença de compostos fenólicos que foram incorporados a partir dos extratos alcoólicos de erva-mate.

TABELA 27 - GRAU DE CRISTALINIDADE RELATIVA PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO COMUM (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

| AMOSTRA | GRAU DE CRISTALINIDADE RELATIVA (%) |
|---------|-------------------------------------|
| (A) | 24,72 ± 0,10 ^d |
| (B) | 30,21 ± 0,13 ^{ab} |
| (C) | 30,16 ± 0,52 ^b |
| (D) | 27,77 ± 0,40 ^c |
| (E) | 30,92 ± 0,37 ^a |

Os amidos de milho comum nativos e modificados apresentaram padrão cristalográfico do tipo A, de acordo com a classificação de ZOBEL (1964), com picos em 15°, 17° e 23° em 2θ. Os picos dos difratogramas de raios X estão apresentados na Tabela 28. Os dados encontrados estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura (KUAKPETOON; WANG, 2006; WEBER; COLLARES-QUEIROZ; CHANG, 2009; MATTA JÚNIOR, 2015)

TABELA 28 - PICOS OBTIDOS POR MEIO DOS DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO (A), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO

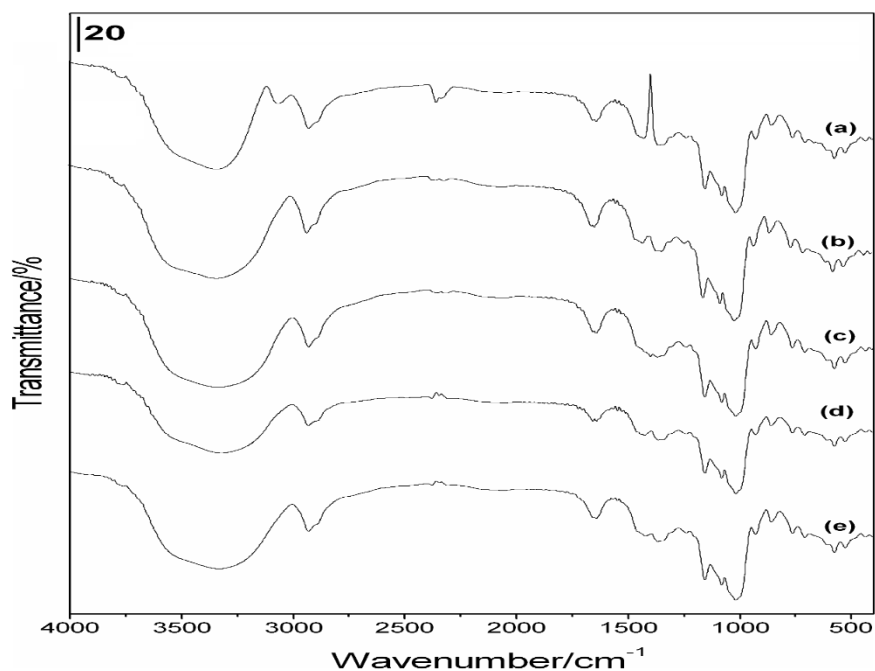
INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (B=EEM1 A 5%), (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%).

| AMOSTRAS | PICOS (°) em 2 θ | | |
|----------|-------------------------|-------|-------|
| (A) | 15,04 | 17,08 | 23,00 |
| (B) | 14,84 | 17,54 | 22,82 |
| (C) | 15,06 | 17,62 | 22,88 |
| (D) | 14,80 | 17,70 | 22,72 |
| (E) | 14,72 | 17,94 | 23,02 |

3.3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

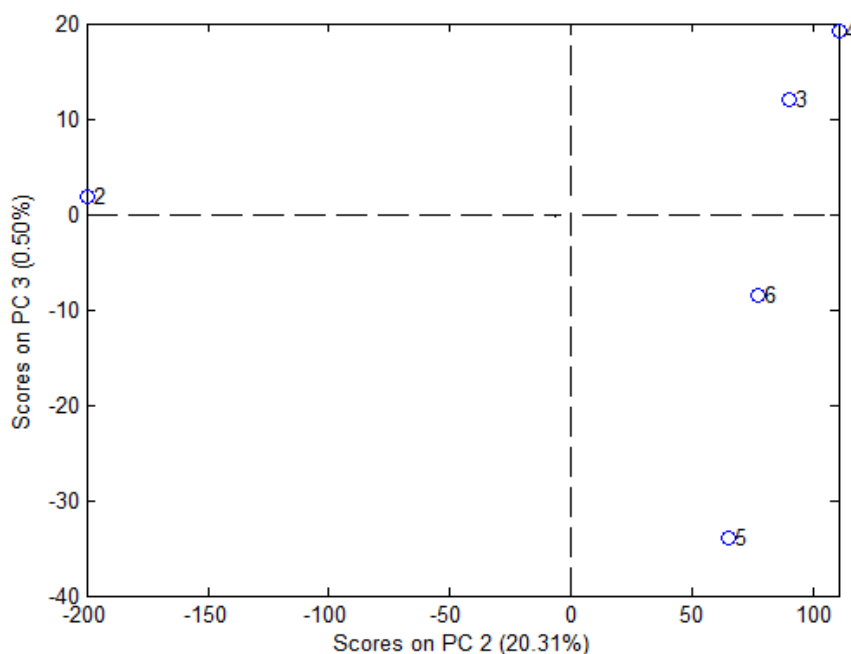
A Figura 39 apresenta os espectros no infravermelho do amido de milho comum nativo (A) e dos amidos modificados com extrato de erva-mate (B, C, D, E).

FIGURA 39 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (4.000 - 400 cm^{-1}) DAS AMOSTRAS DE AMIDOS NATIVO (a) E AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



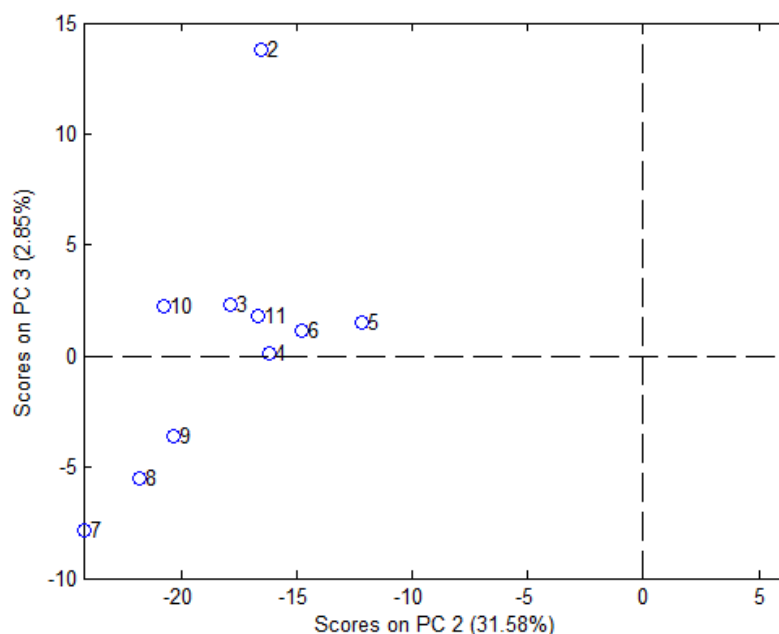
Com o objetivo de verificar se ocorreram mudanças na estrutura molecular dos amidos modificados foi realizado uma análise de componentes principais (PCA). Foram aplicados diferentes pré-processamentos para verificar qual apresentava melhor separação das amostras, através da minimização de interferentes, como ruídos. O pré-processamento que apresentou melhor resultado foi alisamento seguido de segunda derivada. A Figura 40 apresenta o PCA das amostras de milho comum nativo e as tratadas. As amostras são representadas pelos números 2, 3, 4, 5 e 6 que representam respectivamente as amostras A, B, C, D e E. A amostra nativa encontra-se em quadrante diferente das demais amostras. As amostra B e C, que foram tratadas com extrato da amostra 1 de erva-mate encontram-se no mesmo quadrante e em quadrante diferente das amostras C e D. Sendo assim, foi possível verificar uma separação das amostras, mostrando que ocorreu modificações na estrutura do amido após a incorporação do extrato alcoólico de erva-mate.

FIGURA 40 – GRÁFICO DE SCORES DO PCA NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE AMIDO COMUM (A ou 2) AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCOÓLICO DE ERVA-MATE/EEM (B ou 3=EEM1 A 5%), (C ou 4=EEM1 A 15%), (D ou 5=EEM2 A 5%) E (E ou 6=EEM2 A 15%).



Foi realizado uma PCA das amostras de milho comum nativo (2) e tratadas (3, 4, 5 e 6), juntamente com as amostras de amido de milho ceroso nativo (7) e modificados (8, 9, 10 e 11). A primeira componente (PC1) principal explica 63,90% da variância dos dados, sendo os detalhes das amostras explicadas a partir da segunda componente principal. A Figura 41 apresenta o gráfico de scores da PC2 versus PC3. As amostras 3, 4, 5, 6, 10 e 11 se assemelham entre si por estarem no mesmo quadrante e próximas umas das outras. O amido de milho comum nativo se diferencia das demais amostras. Por meio do PCA da Figura 40 foi possível verificar separação entre as amostras analisadas.

FIGURA 41 - GRÁFICO DE SCORES DO PCA NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE AMIDO COMUM (A ou 2) AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCOÓLICO DE ERVA-MATE/EEM (B ou 3=EEM1 A 5%), (C ou 4=EEM1 A 15%), (D ou 5=EEM2 A 5%) E (E ou 6= EEM2 A 15%) JUNTAMENTE COM AMOSTRAS DE AMIDO CEROSO NATIVO (7) AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO CEROSO INCORPORADAS DE EXTRATO DE ERVA-MATE/EEM (8=EEM1 A 5%), (9=EEM1 A 15%), (10= EEM2 A 5%) E (11= EEM2 A 15%).



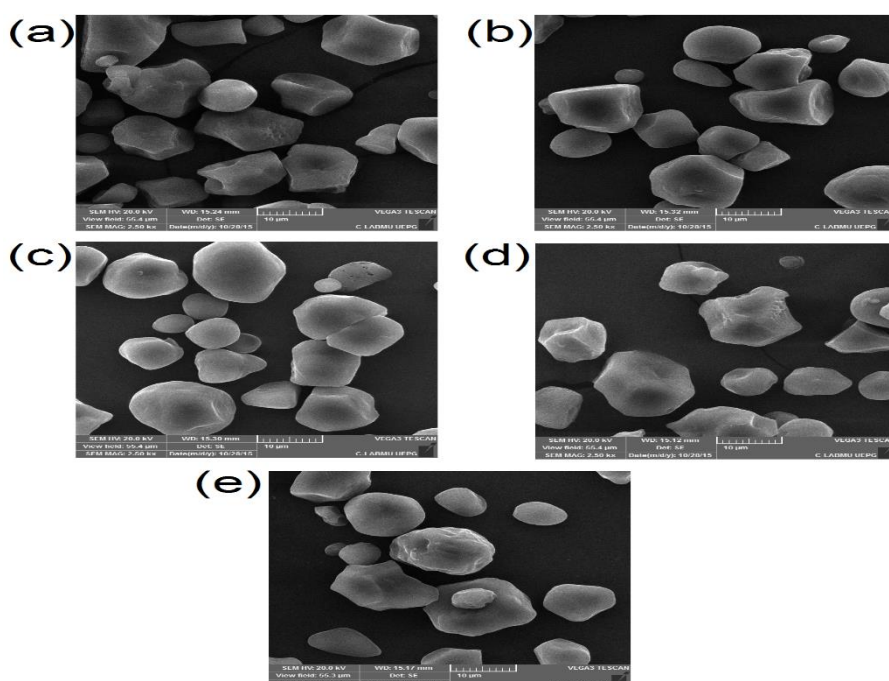
3.3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micro-imagens obtidas no MEV estão apresentadas na Figura 42. O diâmetro médio das amostras foram, respectivamente: (A) $11,59 \pm 3,65 \mu\text{m}$, (B) $15,15 \pm 3,60 \mu\text{m}$, (C) $14,6 \pm 2,62 \mu\text{m}$, (D) $14,52 \pm 2,41 \mu\text{m}$, e (E) $15,26 \pm 2,78^b \mu\text{m}$.

µm. Após a incorporação dos compostos fenólicos nas amostras de amido, como dito anteriormente houve uma mudança estrutural nos grânulos o que ocasionou um aumento no diâmetro médio das amostras tratadas em relação ao amido nativo.

O formato dos grânulos de amido, como já relatado em outros estudos, apresentou uma morfologia poliédrica irregular (BENINCA *et al.*, 2008; LEMES *et al.*, 2014).

FIGURA 42 – MICRO-IMAGENS OBTIDOS NO MEV DAS AMOSTRAS DE AMIDO COMUM NATIVO (a), AMOSTRAS DE AMIDO DE MILHO INCORPORADAS DE EXTRATO ALCÓOLICO DE ERVA-MATE/EEM (b=EEM1 A 5%), (c=EEM1 A 15%), (d= EEM2 A 5%) E (e= EEM2 A 15%).



3.4. CONCLUSÕES

Por meio da análise de compostos fenólicos totais nas amostras de amido de milho comum tratadas foi comprovada que ocorreu incorporação deste compostos provenientes dos extratos de erva-mate.

Através da análise TG/DTG foi verificada que ocorreu um aumento na estabilidade térmica dos amidos pois iniciaram a segunda perda de massa, correspondente à degradação da matéria orgânica em uma temperatura mais elevada.

De acordo com dados obtidos da análise por DSC durante a primeira transição endotérmica, a amostra B, de amido de milho incorporada de extrato alcoólico de erva-mate 1 a 5%) apresentou temperatura inicial e entalpia de gelatinização menor, em relação ao amido nativo. Enquanto as amostras C, D e E respectivamente, amostras de amido de milho incorporadas de extrato alcoólico de erva-mate/EEM (C=EEM1 A 15%), (D= EEM2 A 5%) E (E= EEM2 A 15%), apresentaram temperatura inicial mais elevada que o amido nativo. Somente a amostra D apresentou entalpia de gelatinização maior que o amido nativo.

A análise por RVA mostrou uma semelhança nos perfis das curvas, com um aumento na viscosidade de pico e final para a maioria das amostras tratadas.

Os difratogramas de raios X das amostras de milho comum nativo e tratadas apresentam um padrão cristalográfico do tipo A, onde ocorreu um aumento do grau de cristalinidade relativa das amostras de amido após a modificação com extrato de erva-mate.

Através da análise por FTIR e por PCA foi possível verificar uma separação das amostras, mostrando que ocorreu modificações na estrutura do amido após a incorporação do extrato de erva-mate.

As micro-imagens obtidas no MEV possibilitaram avaliar a estrutura dos grânulos dos amidos, bem como determinar os diâmetros médios, onde foi verificado um aumento nos grânulos de amidos modificados em relação ao nativo.

Os resultados obtidos permitiram avaliar as mudanças térmicas, estruturais e reológicas que ocorrem no amido de milho modificado com extrato aquoso de erva mate.

CONCLUSÕES FINAIS

CONCLUSÕES FINAIS

Os compostos fenólicos que foram extraídos e quantificados nas amostras de erva-mate por HPLC resultaram em valores que variaram entre 0,2 a 1,37mg g⁻¹, 12,324 a 14,892 mg g⁻¹ e 2,5 a 4,01 mg g⁻¹, respectivamente para Ácido Caféico, Ácido 5-Cafeoilquínico e Rutina.

Espectros obtidos no Infravermelho próximo para amostras de erva-mate e os teores definidos por HPLC permitiram o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada utilizando método PLS para determinação dos teores de Rutina, Ácido caféico, Ácido 5-CQA e compostos fenólicos totais (soma dos teores individuais determinados por HPLC).

Os modelos desenvolvidos apresentaram bons resultados de predição dos teores de Rutina, Ácido 5-CQA e compostos fenólicos totais em amostras de erva-mate, com erros de validação de 12,02% (com 5 VL), 5,38% (com 6 VL) e 3,44% (com 4 VL), respectivamente.

A adição de extratos aquosos e alcoólicos de erva-mate ao amido de milho (ceroso e comum) possibilitou a incorporação de compostos fenólicos, determinados através da análise de compostos fenólicos totais.

O amido de milho ceroso incorporado de extrato aquoso de erva-mate elevou a estabilidade térmica do amido, bem como proporcionou uma diminuição na entalpia de gelatinização do mesmo. Ocorreu uma diminuição na viscosidade de pico e viscosidade final em todas as amostras tratadas. As amostras de amido apresentaram padrão cristalográfico do tipo A. Os dados obtidos no FTIR foram submetidos a uma análise de PCA, onde foi verificado que as amostras tratadas se diferem da amostra nativa, caracterizando uma mudança na estrutura do amido.

O amido de milho comum incorporado de extrato alcoólico de erva-mate apresentou aumento na estabilidade térmica em relação ao amido nativo. Após tratadas as amostras apresentaram um aumento na viscosidade de pico e final. As amostras de milho comum nativo e tratadas apresentam um padrão cristalográfico do tipo A, onde ocorreu um aumento do grau de cristalinidade relativa das amostras de amido após a modificação com extrato de erva-mate. Através da análise por FTIR e por PCA foi possível verificar uma separação das

amostras, mostrando que ocorreu modificações na estrutura do amido após a incorporação do extrato de erva-mate.

A incorporação dos compostos fenólicos em amido de milho, a partir de extratos de erva-mate é uma proposta promissora para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, agregando valor devido aos benefícios ofertados pela presença de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

ABITANTE, A. L. *Modelagem dinâmica e análise de um sistema de controle de umidade de folhas de erva-mate em secadores contínuos de esteira*. 78 p. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2007.

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. *Thermochimica Acta*, v. 319, p. 17-25, 1998.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, v. 18, p. 75-81, 2002.

ALCALA, M. *et al.* Analysis of Low Content Drug Tablets by Transmission Near Infrared Spectroscopy: Selection of Calibration Ranges According to Multivariate Detection and Quantitation Limits of PLS Models. *Journal of pharmaceutical sciences*, p. 1-10, 2008.

ALMEIDA, F. M. N. *Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril*. 84f.. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Biológica, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

ALONSO, J.R. *Tratado de Fitomedicina*. Buenos Aires: ISIS, 1998. p. 992-995

ANESINI, C. *et al.* Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Science and Technology*, v. 45, p. 299-304, 2012

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 1999, Santa Cruz do Sul (RS): Erva mate. *Gazeta Grupo de Comunicações*, 1999.

APLEVICZ, K. S.; DEMIANTE, I. M. caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.3, p. 478-484, 2007.

ARÇARI, D. P. *et al.* Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*, v. 17, n. 12, p. 2127-2133, 2009

BAHNASSEY, Y. A.; BREENE W. M. Rapid Visco-Analyzer (RVA) Pasting profiles of wheat, corn, waxy corn, tapioca and amaranth starches in the presence of konjac flour, gellan, guar, xanthan and locust bean gums. *Starch*, v. 4, p. 134-141, 1994.

BALA, M; SINGH, M. Non-destructive estimation of total phenol and crude fiber content in intact seeds of rapeseedemustard using FTNIR. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p. 357-362, 2013.

BAO, Y. P.; FENWICK, R. *Phytochemicals in health and disease*. Marcel Dekker: New York, 2004.

BARROS, A. S.; NUNES, A.; MARTINS, J.; DELGAKILLO, I. Determination of oil and water in olive and olive pomace by NIR and multivariate analysis. *Sens. & Instrumen, Food Qual*, v.3, p. 180–186, 2009.

BASTOS, D.H.M *et al.* Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 538-543, 2006.

BASTOS, D. H. M. *et al.* Yerba maté: Pharmacological, 119 properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, v.1, n. 1, p. 37-46, 2007

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: A practical guide*. New York: Wiley, 1998.

BELLINCONTRO, A. *et al.* Feasible application of a portable NIR-AOTF tool for on-field prediction of phenolic compounds during the ripening of olives for oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 10, p. 2665 - 2673, 2012

BEMILLER, J.N. Starch modification: challenges and prospects. *Starch*, v. 49, n. 4, p 31-127, 1997.

BENINCA C, *et al.* Thermal behavior of corn starch granules modified by acid treatment at 30 and 50°C *Eclética Química*, v. 33, p. 8 – 13, 2008.

BERNAL, C. *et al.* Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 13-18, 2008.

BERTÉ, K. A. S. *Tecnologia da Erva-Mate solúvel*. 160f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFPR, 2011.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BICUDO, S. C. W. *et al.* Thermoanalytical study and characterization of native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O. Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mill). *Eclética Química*, 34, 7-12, 2009.

BLANCO, M. *et al.* Calibration in non-linear near infrared reflectance spectroscopy: a comparison of several methods. *Analytica Chimica Acta*. p. 207 – 214, 1999.

BORTOLUZZI, A. *et al.* Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras comerciais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4, 2006, Posadas. *Anais...* Posadas:UNaM, EPAGRI, p. 143 – 147, 2006.

BOAVENTURA, B. C. B *et al.* Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International*, v. 53, p. 686 -692, 2012.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p.1004 1011, 2004.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, v. 40, p. 393-405, 2007.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *The Analyst*, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

BROAD, N. W. *et al.* Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets. *Analyst*, p. 2207-2211, 2001.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Marcel Dekker, New York, 2001.

CAMPESTRINI, E. Utilização de Equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos estudos de valores nutricionais (Composição química e digestibilidade) de Alimentos para não ruminantes. *Revista Eletrônica Nutritime*, v. 2, n.5, p. 240 – 251, 2005.

CARDOSO JÚNIOR, E. L. *et al.* Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 553-558, 2007.

CARINI, M. *et al.* Characterization of phenolic antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 12, n. 22, p. 1813-1819, 1998.

CANSIAN, R.L. *et al.* Semi-volatile compounds variation among Brazilian populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 175–181, 2008.

CARVALHO FILHO, M. A.S. *Preparação e Estudo Termoanalítico dos Cinamatos de Terras Raras, exceto (Escândio), no Estado Sólido*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

CAVALHEIRO E. T. G. *et al.* A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. *Química Nova*, v. 18, p. 305-308, 1995.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality trends. *Food Science and Technology*, v. 18, p. 72 – 83, 2007.

CHAGAS, I. P. *Desenvolvimento de um fotômetro portátil NIR para determinação do teor de água no álcool combustível e do teor de etanol na gasolina*. 151 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CHAMINADE, P. *et al.* Data treatment in near infrared spectroscopy. *Analysis*, v. 26, n. 4, p. 33 – 38, 1998.

CHEN, Q. *et al.* Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, n. 13, p. 568-573, 2008.

CHENG, T.Y. *et al.* Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 12, p. 388-395, 2001.

CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford, M. N.; Willson, K. C. (Ed.). *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*, New York: Croom Helm, p. 305-374, 1985

CLIFFORD, M.N., RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, v.35, p. 13–21, 1990.

CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins: occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 362 – 372, 1999.

CLIFFORD, M. N.; WU, W.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N. Profiling the Chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LCMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 929-936, 2007.

COATES, J. A review of current new technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy, *Spectroscopy*, 10, 21-34, 1999.

COLLONA, P.; LELOUP, V.; BULÉON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 46, p. 17-32, 1992.

COLOMBO, P. D. RIBOTTA E A. E. L. Differential scanning calorimetry (DSC) studies on the thermal properties of peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 4434-4439, 2010.

CORDOBA, L. P. *Efeito da modificação enzimática nas propriedades térmicas, reológicas e estruturais do amido de pinhão (Araucaria angustifolia)*. 60 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.

CORDOBA, L. P.; BET, C. D. ; SCHNITZLER, E. Study by thermal methods of pinhão starch modified with lactic acid. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, v. 7, p. 41-47, 2015.

COSTA, S. G. da. *A Erva-Mate*. Curitiba, Coleção Farol do Saber, 55p. 1995.

COSTA FILHO, P. A. *Estudo comparativo de técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo*, 201f. Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2003.

COZZOLINO, D.; RESTAINO, E.; FASSIO, A. Discrimination of yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) samples according to their geographical origin by means of near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Sensory & Instrumentation for Food Quality*, v. 4, n. 2, p. 67-72, 2010.

DA CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. *Ciência Florestal*, v. 12, n. 2, p.107-113, 2002.

DAGNEW, M. D.; CROWE, T. G.; SCHOENAU, J. J. Measurement of nutrients in Saskatchewan hog manures using near-infrared spectroscopy. *Canadian Biosystems Engineering*, v. 46, p. 33–37, 2004.

DEETAE, P. *et al.* Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. *Food Chemistry*, v. 133, p. 953-959, 2012.

DEMIATE, I.M.; CEREDA, M.P. Some physico-chemical characteristics of modified cassava starches presenting baking property. *Energia na Agricultura*, v. 15, n. 3, p. 36-46, 2000.

DE MARIA, C. A. B. *et al.* Stability of 5-cafeoylquinic acid under different conditions of heating. *Food Research International*, v. 31, n. 6-7, p. 475-477, 1998.

DE OLIVEIRA, G. A. *et al.* Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. *Food Chemistry*, v. 143, p. 223-230, 2014.

DERAL. *Departamento de Economia Rural*. SEAB, 2013.

DI-MEDEIROS, M. C. B. *et al.* Rheological and biochemical properties of *Solanum Lycocarpum* starch. *Carbohydrate polymers*, v. 104, p. 66-72, 2014.

DUTRA, F. L. G. *Compostos Fenólicos e Metilxantinas em Erva-Mate Armazenada em Sistemas de Estacionamento Natural e Acelerado*, 76f. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, Paraná, 2009.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determination of phenolic compounds by isocratic high performance liquid chromatographic method during storage of yerba-mate. *Química Nova*, v. 33, n.1, p. 119-123, 2010.

ESMELINDRO, M. C., *et al.* Caracterização físico-química da erva-mate: Influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

EVANS, W. C. *Trease and Evans' pharmacognosy*. 15th ed. China: Harcourt, 585 p., 2002.

FELIPPI, R. *et al.* Administration of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reverses endothelial dysfunction in LDL receptor knockout mice. *Free Radical Research*, v. 40, n. 1, p. 104, 2006.

FERNANDES, E. S. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: in vitro and in vivo studies. *Nutrition*, v. 28, p. 1157-1164, 2012.

FILIP, R. *et al.* Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, v. 20, n. 1, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, R. *et al.* Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, v. 72, p.774-778, 2001.

FILIP R.; FERRARO G. E. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. *European Journal of Nutrition*, v. 4, p. 42-50, 2003.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial, *Química Nova*, v.22, n. 5, 1999.

FRANCO, C. M. L. *et al.* Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches. *Cereal Chemistry*, v. 79, p. 243-248, 2002.

FREITAS, R. A. *et al.* A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. *Carbohydrate Polymers*, v. 51, p. 25-32, 2003.

FRESCO, P. *et al.* New insight on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, v. 26, p. 747–766, 2006.

FRIZON C. N. T. *et al.* Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *Food Science and Technology*, v. 60, p. 795-801, 2015.

GAO J, *et al.* Structural modification of waxy, regular, and high-amylose maize and hulless barley starches on partial acid hydrolysis and their impact on physicochemical properties and chemical modification. *Starch*, v. 64, p. 313-325, 2012.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R.; Partial Least-Squares Regression: A Tutorial, *Anal. Chem. Acta*, v. 185, p. 1-17, 1986.

GIOLITO, I. *Apostila de métodos termoanalíticos*, IQ/USP, vol 1 e 2, 1987.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica – Parte 2. *Cerâmica*, v. 34, p. 225, 1988.

GNOATTO, S. C.B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponin in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 4, 723-726, 2005.

GONZALES, A. *et al.* Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*, v. 39, p. 217-237, 1993.

GORZALCZANY, S. R. *et al.* Choleretic effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *Journal Ethnopharmacol*, v. 75, p. 291-294, 2001.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry & Molecular Biology International*, v. 35, p. 47-56, 1995.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in Vivo*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 224, p. 338–344, 1996.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H.; SCHULZE, J.; SOUZA, M. F. Caffeic and chlorogenic acid in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*, v. 80, n. 6, p. 339-344, 2009.

GUILBOT, A.; MERCIER, C. STARCH. In: *The polysaccharides*, v. 3, p 209-273, 1985.

HAN, X. Z.; SHEN, T.; LOU, H. X. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 8, p. 950–988, 2007.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, v. 72, p. 138-151, 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 56, p. 8394-8403, 2008.

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ciência Rural*, v. 31, p. 781-785, 2001.

HELPER, G. A. *et al.* Aplicação de Métodos de Análise Multivariada no Controle Qualitativo de Essências Alimentícias Empregando Espectroscopia no Infravermelho Médio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 779 – 786, 2006.

HIZURUKI, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, v. 141, p. 295-306, 1985.

HOFFMANN-RIBANI, R. Compostos fenólicos em erva-mate e frutas. 137 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. *Princípios de análise instrumental*. 6. ed, Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056 p.

HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, v. 41, p. 269–276, 2000.

HUANG, C. H. *et al.* Production, Characterization, and mechanical properties of starch modified by *Ophiostoma* ssp. *BioResource*, v. 2, p. 257-269, 2006.

IONASHIRO, M. *Fundamentos de Termogravimetria e Análise térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial*. 1. Ed, 80p. São Paulo: Giz, 2005.

JACOB, P. S. *Efeito da erva mate (Ilex paraguariensis) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos*. 161 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

JACQUES, R.A. *et al.* The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, n. 1, p. 6-12, 2007.

JIANG, Q. *et al.* Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed *Zea Mays* L., *Fritillaria ussuriensis* Maxim. and *Dioscorea opposita* Thunb. Starches. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 521-528, 2011.

KAEWATATIP, K.; TANRATTANAKUL, V. Preparation of cassava starch grafted with polystyrene by suspension polymerization. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 647-655, 2008.

KANG, Y. R *et al.* Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Laboratory Animal Research*, v. 28, n. 1, p. 23-29, 2012.

KARIM, A. A.; SUFHA, E. H.; ZAIDUL, I. S. M. Dual modification of starch via partial enzymatic hydrolysis in the granular state and subsequent hydroxypropylation. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 56, p. 10901-10907, 2008.

KAWAKAMI, M.; KOBAYASHI, A. Volatile constituents of green mate and roasted mate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 1275-1279, 1991.

KHOSHESAB, Z. M. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. Edited by Prof. Theophanides Theophile, 2012, p. 236

KLEIN, G. A. *Efeito do consumo da erva-mate (Ilex paraguariensis), associada ou não à intervenção dietética, no perfil glicêmico e lipídico de indivíduos pré-diabéticos e diabéticos tipo 2*. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

KLEIN, G. *et al.* Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*. v. 30, n. 5, p. 320-332, 2011.

KUAKPETOON, D. ; WANG, Y. J. Locations of hypochlorite oxidation in corn straches varying in amylose content. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 90-100, 2008.

KUHNEN, S.*et al.* ATR –FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, p. 1673-1681, 2010.

LACERDA L.G. *et al.* Thermal behavior of corn starch granules under action of fungal α -amylase. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 93, p. 445-449, 2008.

LEMES, B. M. *et al.* Caracterização do amido de milho nativo e ceroso modificado com ácido láctico 1,0 M em diferentes temperaturas. *IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria*, Serra Negra, SP, 2014.

LERTRAT K, THONGNARIN N. Novel approach to eating quality improvement in local waxy corn: Improvement of sweet taste in local waxy corn variety with mixed kernels from super sweet corn. *Acta Horticulture*, v. 769, p. 145-150, 2008.

LIN, L. *et al.* Relationships between amylopectin molecular structures and functional properties of different-sized fractions of normal and high-amylose maize starches. *Food Hydrocolloids*, v. 52, p. 359-368, 2016.

LINHARES, T. *História Econômica do Mate*. Rio de Janeiro: Livraria José Olympio, 1969. 522 p.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*, v. 34, p. 3879 –3485, 2004.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M.P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce – um estudo de caso. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 3, p. 343-345, 1998.

LUO Z. *et al.* Effect of microwave radiation on the physicochemical properties of normal maize, waxy maize and amylo maize V starches. *Starch*, v. 58, p. 458 – 468, 2006.

LUYPAERT, J. *et al.* An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a dermatological cream. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 453-466, 2002.

MACCARI, A.J.; SANTOS, A.P.R. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. *MCT/CNPq/PADCT*, Curitiba, PR, 2000.

MADALOZZO, E. S. *Caracterização físico-química de ricotas via espectroscopia no infravermelho e métodos de calibração multivariada*. Dissertação (Mestrado Ciencia e tecnologia de Alimentos), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

MALHEIROS, G. C. *Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante a armazenagem de erva-mate tipo chimarrão*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2007.

MANO, J. F. *et al.* Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blenda with potential biomedical applicability. *Journal of materials science: Materials In medicine*, v. 14, p. 127-135, 2003.

MANZOCCO, L.; ANESE, M.; NICOLI, M.C. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *LWT*, v. 31, p. 694-698, 1998.

MAO, Z. *et al.* Optimizing the models for rapid determination of chlorogenic acid, scopoletin and rutin in plant samples by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 128, p. 711–715, 2014

MARTENS, H.; Naes, T. *Multivariate calibration*. New York: Wiley, 1996.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MATTA JÚNIOR, M. D. *Características estruturais, físico-químicas e funcionais dos amidos de mandioca e de milho com diferentes teores de amilose oxidados por ozônio*. 123f. Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, USP, Piracicaba, 2015.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, v. 113, p. 1370–1376, 2009.

MAZUCHOWSKI, J.Z. *A Cultura da Erva-mate*. Curitiba: Emater, p. 5-7, 1989.

MAZUR, L. *et al.* Multivariate calibration and moisture control in yerba mate by near infrared spectroscopy. *Acta Scientiarum. Technology (Online)*, v. 36, p. 369-374, 2014.

MAZUR, L. *et al.* Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 35, p. 55-60, 2014.

MENDES, R. M. O. *Caracterização e avaliação da erva-mate (Ilex paraguariensis St Hill) beneficiada no Estado de Santa Catarina*. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2005

MENDHAM, J. *et al.* VOGEL: *Análise Química Quantitativa*. 6. ed. Rio de Janeiro: LCT, 2002.

MENINI, T. *et al.* Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of Paraoxonase-1 in High-Density Lipoprotein. *Planta Med.*, v. 73, p. 1141-1147, 2007.

MIAO, M.; ZHANG, T.; JIANG, B. Characterizations of Kabuli and Desihickpea starches cultivated in China. *Food Chemistry*, v. 113, p.1025–1032, 2009.

MIAO, M. *et al.* Impact of mild acid hydrolysis on structure and digestion properties of waxy maize starch. *Food Chemistry*, v. 126, p. 506 -523, 2011.

MORGANO, M. A. *et al.* Determinação de proteína em Café Cru por Espectroscopia NIR e Regressão PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 25-31, 2005.

MORGANO M. A. *et al.* Determinação de umidade em café cru usando espectroscopia NIR e regressão multivariada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 12-17, 2008.

MOTHÉ, C., G. AZEVEDO, A., D. *Análise térmica de materiais*. Ed. Ieditora: São Paulo, 2002, 300p.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y.K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 24, n. 3, p. 403-406, 2004.

NAES, T. *et al.* A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. *NIR Publications*, 2002.

NAKATANI, N. *Antioxidant and antimicrobial constituents of herbs and spices*. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi* (pp. 251–271). New York: Elsevier

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. *Herbal Medicines*. London: *The Pharmaceutical Press*, p. 189-190, 1996.

NICOLAI, B. M. *et al.* Non destructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biology and Technology*, v. 46, p. 99 - 118, 2007.

NUÑEZ, J. C.; KÄNZIG, R. G. Secanza de yerba mate. In: *Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul*; Winge, H.; Ferreira, A. G.; Mariath, J. E. A.; Tarasconi, L. C.; UFRGS: Porto Alegre, p. 175-180, 1995.

O'HAVER, T. *An introduction to signal processing in chemical analysis*. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland. 2001.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Thermal, structural and rheological behaviour of native and modified waxy corn starch with hydrochloric acid at different temperatures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 13-18, 2014

ORO, T. *et al.* Propriedades de pasta de mesclas de farinha integral com farinha refinada usadas na produção de pães. *Ciência Rural*, v. 43, n. 4, p. 754-760, 2013.

OZAKI, Y. *et al.* *Near-infrared spectroscopy in food science and technology*. USA: Wiley-Interscience, 2007.

PAM. *Produção Agrícola Municipal*. Rio de Janeiro, v.40, p. 1-102, 2013.

PAGLIOSA, C. M. *Caracterização química do resíduo de ervais e folhas "in natura" de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.)*. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PAGLIOSA, C. M. *et al.* Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *Food Chemistry*, v. 122, p. 173–178, 2010.

PARANÁ. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate. *Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate*. Curitiba: Ed. do autor. Série PADCT III, n. 1, p.160, 2000.

PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the physical chemical of starch. *Journal of Cereal Science*, v. 34, p. 1-17, 2001.

PASQUINI, C.; Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Pratical Aspects and Analytical Applications, *Journal Brazilian Chemistry Society*, v. 14, n. 2, p. 198-219 2003.

PEREIRA, J. G. *et al.* Termogravimetria: um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio. *Qumica Nova*, v. 32, p. 1661-1666, 2009.

PEREIRA, D. F. *et al.* Influence of the traditional Brazilian drink Ilex paraguariensis tea on glucose homeostasis. *Phytomedicine*, n. 19, p. 868– 877, 2012.

PRIETO, N. *et al.* Application of near infrared spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, v.83, p.175-186, 2009.

RAMALLO, L. A. *et al.* Contenido nutricional del extracto acuoso de la yerba mate em tres formas diferentes de consumo. *La Alimentacion Latinoamericana*, n. 225, p. 48- 52, 1998.

RAMALLO, L. A. *et al.* Moisture diffusivity, shrinkage, and apparent density variation during drying of leaves at high temperatures. *International Journal of Food Properties*, v. 4, n. 1, p. 163-170, 2001.

RAMALLO, L. A.; LOVERA, N. N.; SCHMALKO, M. E. Effect of the application of intermittent drying on Ilex paraguariensis quality and drying kinetics. *Journal of Food Engineering*, v. 97, p. 188-193, 2010.

RAPHAEL, E. *Eletrolitos sólidos poliméricos a base de amidos de mandioca: nativo, acetilado e oxidado – acetilado*. Dissertação (mestrado) Instituto de Química de São Carlos, USP, 2006.

RIBEIRO, L. F. *et al.* Prediction of linolenic and linoleic fatty acids content in flax seeds and flax seeds flours through the use of infrared reflectance spectroscopy

and multivariate calibration. *Food Research International*, v. 51, p. 848-854, 2013.

RIBEIRO, L. S. *et al.* Influence of some sugars on the termal, rheological and morphological properties of “pinhão” starch. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 117, p. 935-942, 2014.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-056, 1996.

RIZZO, M. *et al.* HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, p. 46–55, 2006.

ROBARDS, K.; ANTOLIVIC, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *The Analyst*, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROSS, J.A.; KASUM.C.M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann. Rev. Nutr.* 22:19-34, 2002.

ROTTA, E.; OLIVEIRA, Y.M.M.; *Cultivo da erva-mate*. Colombo: Embrapa florestas, (Sistemas de produção n.1), 2005.

SANTOS, S. C. L. *Avaliação comparativa entre sistema agroflorestal com erva-mate e fragmento de Floresta Ombrófila Mista quanto à fitossociologia, parâmetros químicos e físicos do solo e ciclagem de nutrientes*. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Paraná, Curitiba.

SAUER, E. *Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por espectroscopia DRIFT*. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, p. 157, 2007.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHINELLA, G. R. *et al.* Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHINELLA, G. R. *et al.* Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHINELLA, G. R.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitricoxide-dependent mechanism. *Clinical Nutrition*, v. 24, p. 360–366, 2005.

SCHMALKO, M. E.; MORAWICKI, R. O.; RAMALLO, L. A. Simultaneous determination of specific heat capacity and thermal conductivity using the finite-difference method. *Journal of Food Engineering*, v. 31, p. 531–540, 1997.

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba mate processing. *Drying technology*, v. 19, n. 3-4, p. 599-610, 2001.

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Modelling the drying of a twig of “yerba mate” considering as a composite material: Part I: shrinkage, apparent density and equilibrium moisture content. *Journal of Food Engineering*, v. 66, p. 455–461, 2005.

SCHMALKO, M. E.; SCIPIONI, P. G.; FERREYRA, D. J. Effect of Water Activity and Temperature in Color and Chlorophylls Changes in Yerba Mate Leaves. *Journal International Journal of Food Properties*, v. 8, p. 313-322, 2007.

SCHNITZLER, E. *et al.* Thermal, rheological and structural analysis of modified green banana starch with hydrochloric acid. *Brazilian Journal of Thermal Analysis*, v. 4, p. 26-31, 2015.

SEAB. SECRETÁRIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. *Erva-mate: prospecção tecnológica da cadeia produtiva*. Curitiba: SEAB, p. 125, 1997.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 576 p., 2004.

SHAHIDI, F. *et al.* Phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars: Chemistry and health effects. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v. 17, p. 380–382, 2008.

SHAN, B. *et al.* The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, v. 117, p. 112–119, 2007.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D.L.; KOWALSKI, B. R. *Chemometrics*, 1^a ed., New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 332.

SIESLER, H. W. *et al.* *Near-Infrared Spectroscopy*. Principles, Instruments, Applications, Wiley – VCH, 2002.

SHI, Y. C. *et al.* Molecular structure of a low-amylopectin starch and other high-amylose maize starches. *Journal of Cereal Science*, v. 27, p. 289-299, 1998.

SHI, R. Ageing of soft thermoplastic starch with high glycerol content. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 103, p. 574-586, 2007.

SHIN, E. C. *et al.* Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*, v. 119, p. 1262 – 1270, 2010.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E, beta-caroteno and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.62, p. 1215S-1321S, 1995.

SILVA, E.L. *et al.* Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*, v. 41, p. 973-979, 2008.

SILVERSTEIN, R. M. BASSLER, G.C. MORRILL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análises Instrumental*. 5. ed. Madrid: McGraw Hill, 2001. 1028 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. *Princípios de análises Instrumental*. 5^o Ed., São Paulo, 2002.

SIMÕES, C. A. M. *et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 833p.

SMITS, A.L. *et al.* Ageing of starch based systems as observed with FT-IR and solid-state NMR spectroscopy. *Starch*, v. 50, p. 478-483, 1998.

SOTELO, F. F. *Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização de petróleo*. Simulação de uma unidade de destilação atmosférica. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, 2006.

SRICHUWONG, S.; JANE, J.-L. Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures: A review. *Food Science and Biotechnology*, v. 16, p. 663–674, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch e composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, p. 151-165, 2004.

THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. *Analytical Chemistry*. v. 66, n. 15, p. 795-804, 1994.

TRUEBA, G. P. Los Flavonóides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed*, v. 1, n. 22, p. 48-57, 2003.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. *Practical Guide for Food Industry* In: Starches. Minnesota: Eagan Press, 1999.

TOZETTO, A. *Controle de Qualidade de Edulcorantes em Adoçantes Comerciais via Espectrometria e Métodos de Calibração Multivariada*. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2005.

VAHER, M.; KOEL, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 990, p. 225-230, 2003.

VALDERRAMA, P. *Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo*, 135f. Dissertação (mestrado) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2005.

VALDUGA, E. *et al.* Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. *Boletim do CEPPA*, v. 15, n.1, p. 25-36, 1997.

VALDUGA, A.T.; FINZER, J.R.D.; MOSELE, S.H. *Processamento de erva-mate*. Erechim: Edifapes, p. 184, 2003.

VANDEGNISTE, B. G. M. *et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – part B*, Amsterdam, 1998.

VIEIRA, M. A. *et al.* Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 4637 - 4642, 2008.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 748-753, 2009.

WENDLANT, W. W. *Thermal analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1986

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. Starch. In: *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Saint Paul: AACC, Eagan Press, 1997. p. 117-151.

WORKMAN, J. J. JR., KOWALSKI, B. R, BRO, R. Review of chemometrics applies to spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.*, v .31, p. 1985-1995, 1996.

WU, Y. *et al.* Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. *Food Research International*, v. 42, p. 221–225, 2009.

WURZBURG, O.B. *Modified starches: properties and uses*. Boca Raton, CRC Press, 277 p., 1986.

XIAOBO, Z. *et al.* Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 667, p. 14–32, 2010.

ZANOELO, E. F. Equilibrium moisture for mate leaves. *Biosystems Engineering*, v. 92, p. 445–452, 2005.

ZANOELO, E. F. *et al.* Superheated steam drying of mate leaves and effect of drying conditions on the phenol content. *Journal of Food Process Engineering*, v. 29, p. 253-268, 2006.

ZANOELO, E. F.; DI CELSO, G. M.; KASKANTZIS, G. Drying kinetics of mate leaves in a packed bed dryer. *Biosystems Engineering*. v. 96, p. 487-494, 2007.

ZANOELO, E. F.; ABITANTE, A.; MELEIRO, L. A. C. Dynamic modeling and feedback control for conveyors-belt dryers of mate leaves. *Journal of Food Engineering*, v. 84, p. 458–468, 2008.

ZHU, F. *et al.* Effect of phytochemical extracts on the pasting, thermal, and gelling properties of wheat starch. *Food Chemistry*, v. 112, p. 919–923, 2009.

ZHU, F. *Interactions of carbohydrates with phenolic compounds*. [PhD thesis]. Hong Kong, China: University of Hong Kong, 2010.

ZHU, F; WANG Y. J. Rheological and thermal properties of rice starch and rutin mixtures. *Food Research International*, v.49, p. 757–62, 2012

ZOBEL, H. F. X-ray analysis of starch granules. *Methods in Carbohydrate chemistry*, v. 4, p. 109-143, 1964.

ZOBEL, H. F.; STEPHEN, A. M. *Starch: Structure, Analysis, and Application*. In: *Food Polysaccharides and their Applications*. (Ed.) STEPHEN, A. M. (Ed.) New York, p. 19-65, 1995.

ZORTÉA, M. E. B. *et al.* Avaliação da viscosidade aparente de pastas de amidos nos viscosímetros brookfield RVDV-II+PRO e rápido visco-analisador RVA-4. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 05, n. 01, p. 326-335, 2011.

